



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SOLUNUM YOLLARINDAN İZOLE EDİLEN *Mannheimia*
haemolytica SUŞLARININ TIPLENDİRİLMESİ, BAZI
VİRÜLENS GENLERİ İLE ANTİMİKROBİYAL MADDELERE
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Cihat ÖZTÜRK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN

VAN-2020

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLUNUM YOLLARINDAN İZOLE EDİLEN *Mannheimia*
haemolytica SUŞLARININ TİPLENDİRİLMESİ, BAZI
VİRÜLENS GENLERİ İLE ANTİMİKROBİYAL MADDELERE
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Cihat ÖZTÜRK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN

VAN-2020

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-7156 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında **Cihat ÖZTÜRK** tarafından hazırlanan “**Solunum yollarından izole edilen *Mannheimia haemolytica* suşlarının tiplendirilmesi, bazı virülens genleri ile antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarının araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/07/2020

Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Kamil EKİCİ
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ziya İLHAN
Balıkesir Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Semiha DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Solunum yollarından izole edilen *Mannheimia haemolytica* suşlarının tiplendirilmesi, bazı virülens genleri ile antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarının araştırılması” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Cihat ÖZTÜRK

Tarih: 01/07/2020

İmza:

TEŞEKKÜR

Doktora Tez çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. İsmail Hakkı Ekin başta olmak üzere Mikrobiyoloji A.D. öğretim üyeleri hocam Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Özgül GÜLAYDIN'a, referans *Mannheimia haemolytica* suşunun temininde destek olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Arzu FINDIK'a, çalışmamın istatistiksel analizinin yapılması ve yorumlanmasında yardım eden Prof. Dr. Abdullah YEŞİLOVA ve Arş. Gör. Dr. Ahmet Fatih DEMİREL'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim tüm aileme, hayatın yükünü birlikte paylaştığım, tez çalışmam boyunca manevi desteğini her daim bana hissettiren sevgili eşim Sultan ÖZTÜRK'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, çalışmaya maddi destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

Öztürk C, Solunum Yollarından İzole Edilen *Mannheimia haemolytica* Suşlarının Tiplendirilmesi, Bazı Virülens Genleri ile Antimikrobiyal Maddelere Duyarlılıklarının Araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Veteriner Programı, Doktora Tezi, Van, 2020. Bu çalışmada, hasta ve sağlıklı sığır ve koyunların solunum yollarından izole edilen *Mannheimia (M.) haemolytica* izolatlarının biyokimyasal özellikleri, önemli virülens genlerinin dağılımı, antimikrobiyal maddelere duyarlılıkları ve direnç genlerinin tespit edilmesi amaçlandı. Nazo-farengiyal ve trake-bronşiyal sıvay örneklerinden kültürü yapılan *M. haemolytica* şüpheli 55 izolatın 48 (%87.3)'i Real Time PCR ile *M. haemolytica* olarak tanımlandı. İncelenen izolatlarda, hastalık ve virülens genleri ile ilişkili biyokimyasal özelliklerin arginin-arginin ve sorbitol testlerindeki farklılıklara göre 4 farklı biyokimyasal profil belirlendi. Real Time-PCR yöntemiyle virülens genleri incelenen izolatlarda 3 virülens gen profili tespit edildi. İzolatların %37.5'i I, %33.3'ü III ve %12.5'i II olarak belirlendi. Virülens gen profili II'ye sahip izolatlarda virülens ile ilişkili genlerin tamamı belirlenirken, profil I'e sahip izolatlarda *nmaA*, profil III'e sahip izolatlarda ise *nmaA* ve *tbpB* genlerinin bulunmadığı tespit edildi. Bununla birlikte biyokimyasal profil II'nin hastalık olguları ile ilişkili ve bunun arginin-arginin negatiflik ile ilişkili olduğu belirlendi. Ayrıca virülens gen profili I özelliğine sahip izolatların sadece biyokimyasal profil I ile ilişkili olduğu ve bunun arginin-arginin negatiflikten kaynaklandığı belirlenirken, arginin-arginin pozitif izolatlar ile virülens gen profili III arasındaki ilişkinin önemli olduğu gözlemlendi. Ayrıca, epsilometer test (E-test) ile antimikrobiyal duyarlılıkları ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri incelenen izolatların 9 (%18.75)'ünde antimikrobiyal direnç belirlendi. E test ile dirençli bulunan izolatların 1'i sadece eritromisine, 2'si sadece penisiline, 1'i tilmikosin ve penisiline, 1'i tilmikosin, streptomisin ve penisiline, 1'i eritromisin, tilmikosin, streptomisin ve tetrasikline, 3'ü eritromisin, tilmikosin, streptomisin, tetrasiklin, penisilin ve ampisiline dirençli olduğu tespit edildi. Dirençli bulunan izolatların büyük çoğunluğunda (%66.6) çoklu direnç olduğu gözlemlendi. E test ile dirençli olduğu belirlenen 9 izolatın 6 (%66.6)'sında makrolid *erm42*, *mphE*, *msrE* genleri ve bu izolatların da 5 (%55.5)'inde aminoglikozid direnç geni *strA* tespit edildi. Sonuç olarak; arginin-arginin negatiflik ile *gcp*, *gs60*, *tbpB*, *lktC*, *adh* pozitif, *nmaA* negatif izolatların kommensal ve patojen *M. haemolytica* izolatlarının ayırımında kullanılacak epidemiyolojik kriter olabileceği ve konu ile ilgili yeni çalışmaların yapılması gerektiği, ayrıca *M. haemolytica* izolatlarında *erm42*, *mphE*, *msrE* genlerinin makrolid, *strA* geninin de aminoglikozid direncinden sorumlu genler olduğu ve total DNA'da tespit edilebildiği, *tetH* ve *bla_{ROB-1}* genlerinin total DNA'da tespit edilemediği ve bu genlerin plazmid ve transpozon gibi ekstrakromozomal DNA'da belirlenebileceği, bundan dolayı antimikrobiyal direnç geni ile ilgili başka mekanizmaların araştırılmasına yönelik yeni çalışmaların yapılması gerekliliği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal Duyarlılık, Biyokimyasal Profil, Direnç Genleri, *Mannheimia haemolytica*, Virülens Genleri

ABSTRACT

Öztürk C, Typing and Investigation of Some Virulence Genes with Antimicrobial Susceptibility of *Mannheimia haemolytica* Strains Isolated from Respiratory Tracts, Van Yuzuncu Yil University, Health Science Institute, Microbiology Department, Veterinary Programme, Ph.D. Thesis, Van, 2020. In this study, it was aimed to determine the biochemical properties, distribution of important virulence genes, antimicrobial susceptibilities and resistance genes of *Mannheimia (M.) haemolytica* isolates identified from the respiratory tracts of sick and healthy cattles and sheeps. 48 (87.3%) of 55 *M. haemolytica* isolates found suspicious cultured from naso-pharyngeal and trachea-bronchial swaps were identified as *M. haemolytica* by Real Time-PCR. According to the differences in arginine-arginine and sorbitol tests, 4 different biochemical profiles were determined in the isolates examined. Three virulence gene profiles were detected in the isolates examined by Real Time-PCR. 37.5%, 33.3%, 12.5% of the isolates examined were identified as I, III and II, respectively. While all virulence-related genes were identified in the isolates with virulence gene profile II, it was determined that there were no *nmaA* gene in profile I isolates and *nmaA* and *tbpB* genes in profile III isolates. At the same time, it was determined that biochemical profile II was associated with disease cases and this was related to arginine-arginine negativity. In addition, it was determined that isolates with virulence gene profile I were associated only with biochemical profile I and that this was due to arginine-arginine negativity, whereas the relationship between arginine-arginine positive isolates and virulence gene profile III was found to be significant. Furthermore, antimicrobial resistance was determined in 9 (18.75%) of the isolates whose antimicrobial susceptibilities and minimum inhibitory concentration (MIC) values were examined by epsilometer test (E-test). One and two isolates were found to be resistant to erythromycin and penicillin, respectively. Also, the antimicrobial resistance was found to tilmicosin and penicillin in one isolate. One of the isolates examined was found antimicrobial resistance to tilmicosin, streptomycin and penicillin, too. One erythromycin-tilmicosin-streptomycin resistant isolate also exhibited resistance to tetracycline. Beside, three erythromycin-tilmicosin-streptomycin-tetracycline resistant isolates was found resistance to penicillin and ampicillin, too. Multiple resistance was observed in the majority of the resistance isolates (66.6%). The macrolide *erm42*, *mphE*, *msrE* genes were found in 6 (66.6%) of the 9 isolates determined to be resistant by E test, and the aminoglycoside resistance gene *strA* was detected in 5 (55.5%) of these isolates, too. As a result; arginine-arginine negativity and *gcp*, *gs60*, *tbpB*, *lktC*, *adh* positive, *nmaA* negative isolates may be the epidemiological criteria that can be used to differentiate commensal and pathogen *M. haemolytica* isolates and new studies on the subject should be done. Also, it was conclude that in *M. haemolytica* isolates, *erm42*, *mphE*, *msrE* genes are responsible for macrolide resistance genes and *strA* gene is the genes responsible for aminoglycoside resistance and these genes can be detected in total DNA, while the *tetH* and *bla_{ROB-1}* genes could not be detected in total DNA. it is suggested that *tetH* and *bla_{ROB-1}* genes can be identified in extrachromosomal DNA such as plasmids and transposons, and therefore new studies to investigate other mechanisms related to the antimicrobial resistance gene are required.

Key Words: Antimicrobial Susceptibility, Biochemical Profile, *Mannheimia haemolytica*, Resistance Genes, Virulence Genes

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Etik Beyan.....	III
Teşekkür.....	IV
Özet.....	V
Abstract.....	VI
İçindekiler.....	VII
Simgeler ve Kısaltmalar.....	X
Şekiller Listesi.....	XI
Tablolar Listesi.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. <i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın Genel Özellikleri.....	5
2.1.1. Tarihçe ve sınıflandırma.....	5
2.1.2. <i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın morfolojik ve kültürel özellikleri.....	7
2.2. <i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın Neden Olduğu Enfeksiyonların Patogenezi.....	8
2.3. <i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın Virülens Faktörleri ve Genleri.....	9
2.3.1. Kapsül.....	9
2.3.2. Lipopolisakkarit.....	10
2.3.3. Adhezinler.....	12
2.3.4. Dış membran proteinleri (OMP) ve lipoprotein.....	13
2.3.5. Hücre dışı enzimler ve toksinler.....	14
2.4. <i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın İdentifikasyonu.....	17
2.4.1. Biyokimyasal özellikler.....	17
2.4.2. Moleküler identifikasyon.....	19
2.5. Antimiktobiyal Duyarlılık.....	21
2.6. Antimikrobiyal Direnç Genleri.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Gereç.....	24
3.1.1. Sıvay örnekleri.....	24

3.1.2.	Bakteri izolatları.....	24
3.1.3.	Referans suş.....	25
3.1.4.	Besiyerleri.....	25
3.1.5.	Antibiyotik disk ve E-test stripleri.....	25
3.1.6.	Çalışmada kullanılan çözelti ve ayıraçlar.....	26
3.2.	Yöntem.....	26
3.2.1.	Sıvap örneklerinin alınması.....	26
3.2.2.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarının izolasyonu.....	27
3.2.3.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarının identifikasyonu.....	27
3.2.4.	Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi.....	31
3.2.5.	<i>M. haemolytica</i> 'nın virülens ile ilişkili genlerinin tespiti.....	32
3.2.6.	Antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi.....	33
3.2.7.	Antimikrobiyal direnç genlerinin tespiti.....	34
3.2.8.	İstatistiksel analiz.....	36
4.	BULGULAR.....	37
4.1.	<i>Mannheimia haemolytica</i> 'nın İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	37
4.1.1.	İzolasyon.....	37
4.1.2.	İdentifikasyon.....	37
4.2.	Biyokimyasal Özelliklerin Dağılımı.....	39
4.3.	Virülens ile İlişkili Genlerin Belirlenmesi.....	43
4.3.1.	Virülens ile ilişkili gen profilleri.....	43
4.3.2.	<i>Mannheimia haemolytica</i> izolatlarında belirlenen ana biyokimyasal profillerde virülens ile ilişkili gen profillerinin dağılımı.....	44
4.4.	Biyokimyasal Profillerin, Virülens ile İlişkili Gen Profili ve Hayvanların Sağlık Durumu ile İlişkisi.....	44
4.5.	Antimikrobiyal Duyarlılık.....	45
4.5.1.	Disk difüzyon testi.....	45
4.5.2.	MİK değerlerinin belirlenmesi.....	47
4.6.	Antimikrobiyal Direnç Genleri.....	51
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
	KAYNAKLAR.....	67

ÖZGEÇMİŞ.....	80
EKLER.....	81
Ek 1: Etik Kurul Raporu.....	81
Ek 2: Tez Orjinallik Raporu.....	83



SİMGELER VE KISALTMALAR

BHI	: Brain Heart Infusion
bp	: Baz çifti
CLSI	: Klinik Labaratuvar Standartları Enstitüsü
EUCAST	: Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi
F	: Forward
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
Ig	: İmmun Globulin
kDa	: Kilodalton
LFA	: Lenfosit Fonksiyonu ile İlişkili Antijen
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MLST	: Çoklu Bölge Sekans Tiplendirme
MR	: Metil Red
NARMS	: Amerika Ulusal Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi
NF	: Nazo-farengiyal
ONPG	: O-nitrophenyl-beta-D-galactoside
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
R	: Reverse
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
rRNA	: Ribozomal RNA
SIM	: Sulfur-Indol-Motility
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
TB	: Trake-bronşial
TSA	: Tryptik Soy Agar
TSI	: Triple Sugar Iron
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UDP	: Uridine-5'-Triphosphate
VP	: Voges-Proskauer

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	BD Pheonix™ Gram negatif bakteri identifikasyon paneli.....	32
Şekil 2.	Real Time-PCR ile incelenen <i>M. haemolytica</i> izolatlarından elde edilen pozitif amplifikasyon sonuçları.....	38
Şekil 3.	Real Time-PCR'da elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüleri.....	38
Şekil 4.	BD Pheonix™ otomatize bakteri identifikasyon sisteminde <i>M. haemolytica</i> olarak identifiye edilen bir izolatın sonuç raporu.....	40
Şekil 5.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarında arginin-arginin ve sorbitol test sonuçlarına göre belirlenen biyokimyasal profillerin dendogram analizi, virülens ile ilişkili gen profilleri ve antimikrobiyal direnç genlerinin dağılımı.....	42
Şekil 6.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarında inhibisyon zon çapları.....	46
Şekil 7.	MİK değerlerinin E-test yöntemi ile tespiti.....	47

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	<i>M. haemolytica</i> 'nın bazı biyokimyasal özellikleri.....	17
Tablo 2.	Çalışmada incelenen örneklerin kaynağı, hayvan türü ve sağlık/hastalık durumlarına göre dağılımı.....	24
Tablo 3.	<i>M. haemolytica</i> spesifik oligonükleotid dizisi.....	30
Tablo 4.	Biyokimyasal profillerin belirlenmesi amacıyla kullanılan biyokimyasal parametreler.....	31
Tablo 5.	Virülens ile ilişkili genlerin oligonükleotid dizileri ve bağlanma sıcaklıkları.....	32
Tablo 6.	Antimikrobiyal direnç genlerinin tespitinde kullanılan oligonükleotid dizileri.....	35
Tablo 7.	Antimikrobiyal direnç genlerinin tespitinde uygulanan Real Time-PCR protokolleri.....	36
Tablo 8.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarının hayvan türü ve sağlık/hastalık durumlarına göre dağılımı.....	39
Tablo 9.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarında değişkenlik tespit edilen 4 ana biyokimyasal test sonucuna göre belirlenen biyokimyasal profiller.....	41
Tablo 10.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarında tespit edilen virülens ile ilişkili genler.....	43
Tablo 11.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarında tespit edilen virülens ile ilişkili gen profilleri.....	43
Tablo 12.	<i>M. haemolytica</i> izolatlarında tespit edilen virülens ile ilişkili gen profillerinin ana biyokimyasal profillerdeki dağılımı.....	44

Tablo 13. Arginin-arginin ve sorbitol pozitif/negatif <i>M. haemolytica</i> izolatlarının hastalık ve virülens gen profilleri ile ilişkisi.....	45
Tablo 14. <i>M. haemolytica</i> izolatlarında belirlenen virülens ile ilişkili gen profillerinin hayvanların sağlık/hastalık durumlarına göre dağılımı.....	45
Tablo 15. <i>M. haemolytica</i> izolatlarının disk difüzyon testinde kullanılan antimikrobiyal maddelere karşı <i>in vitro</i> duyarlılıkları.....	46
Tablo 16. <i>M. haemolytica</i> izolatlarında antimikrobiyal maddeler için E-test ile belirlenen MİK değerleri.....	48
Tablo 17. E-test ve disk difüzyon testi ile dirençli bulunan izolatlar ve antimikrobiyal duyarlılıkları belirlenen tüm izolatların MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri.....	49
Tablo 18. E-test ve disk difüzyon testlerinde dirençli bulunan <i>M. haemolytica</i> izolatlarında belirlenen fenotipik direnç profilleri.....	50
Tablo 19. E-test ile dirençli bulunan 9 izolatta tespit edilen direnç genlerinin antimikrobiyal madde gruplarındaki dağılımı.....	51
Tablo 20. E-test ile dirençli bulunan <i>M. haemolytica</i> izolatlarında belirlenen fenotipik direnç profillerinde direnç gen profillerinin dağılımı.....	52

1.GİRİŞ

İnsanların bedensel ve zihinsel gelişiminde gerekli olan ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için hayvansal kaynaklı proteine gereksinim duyulmaktadır. Sağlıklı bir toplumda bireylerin yeterli ve dengeli beslenmesinde hayvansal protein alması gerekliliği ülkelerin öncelikli konuları arasında olmasından dolayı, teknoloji ve sanayileşme politikaları gelişmesine rağmen hayvancılık sektörü, gelişen ve gelişmekte olan ülkeler için stratejik önemini hala korumaktadır. Dünya genelinde et üretiminin yaklaşık %30'u sığırlardan, %5'i ise küçükbaş hayvanlardan sağlanırken, ülkemizde et ihtiyacının %88'i sığır, %12'si ise küçükbaş hayvanlardan karşılanmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, Türkiye'de 2019 yılında 17 milyon 872 bin büyükbaş, 48 milyon 481 bin küçükbaş hayvan bulunmaktadır. Türkiye'de sığır sayısı en fazla olan illerin başında Balıkesir, Erzurum, İzmir, Kars ve Konya illeri olup, sığır varlığının %20'sini bu iller oluşturmaktadır. Küçükbaş hayvan varlığının en fazla olduğu iller ise, Ağrı, Konya, Mersin, Şanlıurfa ve Van illeridir. Bu iller küçükbaş hayvan varlığının %22'sini oluşturmaktadır. Hayvancılığın gerek ekonomik gerek sağlık açısından önemi hayvan sağlığını da gündeme getirmiştir (Et ve Süt Kurumu, 2016; TAGEM, 2018; TÜİK, 2019).

Gelişmekte olan ülkeler toplam hayvansal üretiminin %30'unu hayvan hastalıkları nedeniyle kaybetmektedirler (Şentürk, 2015). Global Animal Medicine Association (2019)'ın bildirdiğine göre her yıl tümüyle önlenebilir hastalıklardan dolayı dünya genelinde her beş çiftlik hayvanından bir tanesi ölmekte ve bu hastalıklardan kaynaklı olarak meydana gelen verim kayıpları ile birlikte üreticiler, dünya genelinde her yıl 20 milyar dolar kayıp yaşamaktadır. Bu kayıplara neden olan en önemli problemlerden birinin solunum yolu hastalıkları olduğu rapor edilmiştir (Bell, 2008; Statham, 2018).

Pnömonik pastörelloz, sığır, koyun ve keçilerde tüm dünyada önemli ekonomik kayıplara neden olan bir solunum sistemi hastalığıdır (Yavrucu, 2008; Hossain, 2014; Ahmed, 2017). Küçük ruminant ölümlerinin %50'sinin, sığır ölümlerinin %30'unun pnömonilerden meydana geldiği rapor edilmiştir (Adamu, 2007; Kumar ve ark., 2014). Hastalığın global ekonomiye etkisi tüm dünyada kabul görmüş, bazı ülkelerde yıllık

yaklaşık 1 milyar doları bulan ekonomik kayba neden olduğu bildirilmiştir. Yalnızca İngiltere’de 1.9 milyon sığırın pnömoniye yakalandığı ve hastalığın yıllık 60 milyon pound zarar meydana getirdiği bildirilmiştir (Boudreaux, 2004; Rahal ve ark., 2014; Statham, 2018).

Akdeniz, Afrika ve Güneydoğu Asya küçük ruminantlar açısından et, süt ve yün gibi hayvansal ürünlerin değerlendirildiği dünyada önemli bölgelerdendir (Kumar ve ark., 2014). Dünya genelinde koyun pnömonileri bilhassa yeni doğan ve besi kuzularında yaygın olarak ortaya çıkarken, yetişkin koyun sürülerinde ise atipik klinik belirtiler ile görülebilmektedir. Hastalığın oluşumunda birçok virüs ve bakterinin rol almasının yanı sıra, olumsuz iklim şartları, tozlu ağıl çevreleri, yetersiz ve dengesiz beslenme, transport ve intansif yetiştiricilik gibi immun sistemi deprese edebilen stres faktörleri, hastalığın şekillenmesinde önemli etiyolojik faktörler arasında bulunmaktadır. Yoğun sürüler halinde intansif yetiştirilen küçükbaş sürülerinde pnömoni riski ve şiddeti daha fazla görülmektedir. Ağıl ortamında yeterli hava sirkülasyonunun olmaması, hayvanlar için yeterli alanın bulunmaması ve yakın temas, infeksiyöz etkenin koyunlar arasında daha hızlı yayılmasına neden olmaktadır. Ayrıca kalabalık yetiştiricilik sonucu ağılda amonyak gazı oluşumunun fazla olması, solunum mukozasını tahriş ederek immun sistemin enfeksiyonla mücadele yeteneğini azalttığı için klinik hastalık tablosu ortaya çıkabilmektedir (Öztürk ve Civelek, 2007).

Pnömonilerin koyun sürülerinde ortaya çıkmasında çevresel faktörlerin yanısıra hayvanların üst solunum yollarının (nazofarinks, tonsilla ve mukoz membranlar) normal bakteriyel florasında fakültatif olarak bulunan, bakteriler, virüsler ve paraziter etkenler önemli etiyolojik ajanlar olarak rol oynamaktadır. Bu etkenler, immun sistemin baskılandığı stres faktörlerinde oportunistik patojen haline geçerek pnömoniye neden olabilmektedirler (Ahmet, 2003; Öztürk ve Civelek, 2007). Koyunlarda meydana gelen pnömoni vakalarında yapılan bakteriyel incelemelerde *Mannheimia (M.) haemolytica*, *Pasteurella (P.) multocida*, *Mycoplasma spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus spp.* ve *Staphylococcus spp.*’nin hastalığın oluşumunda primer ve sekonder etkenler olduğu, viral incelemelerde *Parainfluenza Virus-3*, *Adenovirus*, *Respiratory Syncytial Virus*, *Lentivirus*, *Reovirus* ve *Herpes* virüslerin rol aldığı, paraziter incelemelerde ise *Dictyocaulus filaria*, *Prostrongylus rufescens* ve *Muellerius capillaris*’in tespit edildiği

bildirilmiştir (Beytut ve ark., 2002; Öztürk ve Çorlu, 2006; Yüzbaşıgil, 2010).

Sığırların solunum yolu hastalığı veya shipping fever özellikle besi sığırı yetiştiriciliğinde %75 morbidite ve %50 mortaliteye neden olması dolayısıyla en yaygın hastalıklardan biri olarak bilinmektedir (Adamu, 2007; Arslan ve Özcan, 2018). Hastalığın oluşumunda bakteriyel, viral ve paraziter ajanlarla birlikte süttten kesme, transport, tozlu ve yetersiz ahır şartları, ekstrem hava koşulları gibi çok sayıda etiyojik etkene bağlı olarak şekillenebilmektedir. Hastalığın oluşumunda *M. haemolytica*, *P. multocida*, *Histophilus somni* ve *Mycoplasma bovis*'in primer ve sekonder bakteriyel etkenler olarak rol aldığı, viral etkenler olarak *Bovine Viral Diarrhea Virus*, *Bovine Herpesvirus tip-1*, *Bovine Respiratory Syncytial Virus* ve *Parainfluenza Virus-3* bulunurken, paraziter etken olarak da *Dictiocaulus viviparus*'un saptandığı bildirilmiştir (Kehrenberg ve ark., 2001; Lee ve ark., 2003; Bell, 2008; Aulik ve ark., 2011; Rosadio ve ark., 2011; Saeed, 2016).

M. haemolytica çeşitli hayvan türlerinin solunum yolu florasında kommensal olarak bulunması nedeniyle, solunum yolu enfeksiyonlarında primer ve sekonder bakteriyel etken olarak bulunmasına rağmen, özellikle ülkemizde yeterli sayıda epidemiyolojik çalışma bulunmamaktadır. Etkenin solunum yollarından izole edilmesi hastalık tablosunun meydana gelmesinde tek başına yeterli görülmemektedir (Highlander, 2001; Kisiela ve Czuprynski, 2009). Bazı araştırmacılar, sağlıklı ve hasta hayvanlardan izole etikleri *M. haemolytica* suşlarında serotipik farklılıklar olabileceğini bildirmelerine rağmen, kommensal *M. haemolytica* ile patojen *M. haemolytica* arasında belirgin farklılıklar bildirilmemiş ve florada bulunan suşların hangi mekanizma ile hastalık olgularında patojen hale geldiği hala cevabı aranan sorular arasında yer almaktadır (Boudreaux, 2004; Ksiella ve Czuprynski, 2009; Singh, 2011; Caswell, 2016).

Ülkemizde yapılan münferit çalışmalarda koyun ve sığırların akciğer örneklerinden konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler ile *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izolasyon ve identifikasyonu yapılmış ve izole edilen suşların çeşitli antimikrobiyal maddelere karşı in vitro duyarlılıkları araştırılmıştır (Önat ve ark., 2010; Tel ve Keskin, 2010). Yapılan bazı çalışmalarda ise mezbahada kesimi yapılan koyun, keçi ve sığırların akciğerlerinden alınan örneklerden izole edilen *M. haemolytica* ve *P.*

multocida suşlarının PCR ile teşhisi yapılmış ve *in vitro* antimikrobiyal duyarlılıkları tespit edilmiştir (Özbey ve Muz, 2004; Ülker ve ark., 2012).

Van ve yöresinde bugüne kadar sığır ve koyunların solunum yolu hastalıklarının etiyojisine ilişkin az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Konuyla ilgili olarak, mezbahada kesimi yapılan koyun ve keçilerden alınan akciğer örneklerinden *P. multocida* ve *M. haemolytica* bakteriyolojik yöntemlerle izole edilmiştir (Yener ve ark., 2001). İlhan ve Keleş'in (2007) yaptığı bir çalışmada pnömonili koyun akciğerlerinden izole edilen *M. haemolytica* suşlarının konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle biyotiplendirildiği ve kapsüler serotipik farklılıklarının belirlendiği bildirilmiştir. Solmaz ve İlhan (2011) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise *M. haemolytica*'nın çeşitli antimikrobiyal maddelere karşı duyarlılıklarının tespiti yapılmıştır. Gülaydın ve Gürtürk (2018) tarafından yapılan bir çalışmada Van ilinde mezbahada kesimi yapılan hasta/sağlıklı sığırlardan alınan nazo-farengiyal ve trake-bronşial sıvap örneklerinden izole edilen *P. multocida*'nın PCR ile teşhisi ve kapsüler tipleri araştırılmıştır.

Bu çalışmada ise Van İli belediye mezbahasında kesimi yapılan sığır ve koyunların solunum yollarından ve sahada klinik olarak solunum yolu problemi tespit edilen sığır ve koyunların üst solunum yollarından örneklerin alınarak *M. haemolytica*'nın identifikasyonu, biyokimyasal profillerinin ve virülens ile ilişkili bazı önemli genlerinin varlığının ortaya konulması, ayrıca elde edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi ve dirençli bulunan suşların direnç genlerinin araştırılması ile kommensal ve patojen *M. haemolytica* suşları arasındaki farklılığın tespit edilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Mannheimia haemolytica*'nın Genel Özellikleri

2.1.1. Tarihçe ve sınıflandırma

M. haemolytica; Bacteria aleminin, Proteobacteria bölümü, Gamma proteobacteria sınıfı, Pasteurellales takımı, Pasteurellaceae familyası, *Mannheimia* cinsi içerisinde yer almaktadır. Bu familya içerisindeki mikroorganizmalar kanatlı, memeli, sürüngen ve bazen de amfibik konakçıların solunum, sindirim ve üreme sistemlerinde bulunabilmektedir (Yavrucu, 2008). Son 20 yılda hızla gelişen 16S rRNA sekans analizleri ve diğer moleküler teknikler, Pasteurellaceae familyası içerisinde bulunan birkaç yeni cins, kabul edilen yaklaşık 58 tür ve taksonomide isimlendirilmemiş 25 takımın tanımlanmasına kapı aralamıştır (Christensen ve Bisgaard, 2004; Catry, 2005). Bu familya içerisinde bulunan 7 cins, veteriner hekimlik açısından önem arz etmektedir. Bunlar, *Haemophilus* (Broom ve Sneath, 1981), *Pasteurella* (Mutters ve ark., 1985), *Mannheimia* (Angen ve ark., 1999), *Histophilus* (Angen ve ark., 2003), *Actinobacillus* (Christensen ve Bisgaard, 2004), *Avibacterium* (Blackall ve ark., 2005) ve *Biberstenia* (Blackall ve ark., 2007) cinsleridir (Quinn, 2011).

Pasteurella cins ismi, bir İtalyan kontu olan Trevisan tarafından Louis Pasteur'ün tavuk kolerası üzerine çalışmalarına ithafen verilmiştir. *Pasteurella* cinsi, izole edildiğinden günümüze kadar taksonomik olarak birçok değişikliğe uğramıştır. Tavuklarda kolera etkenlerinden izole edilen *M. haemolytica*, önceleri *Bacterium bipolare multocidum* olarak isimlendirildi. Daha sonra yapılan çalışmalar neticesinde etken 2 alt gruba ayrılarak, ruminantlarda fibrinöz pnömoniye neden olan etken *P. bovisseptica*, hemorajik sepsisemiye neden olan ve şimdi *P. multocida* olarak adlandırılan etken de *P. haemorrhagic septicemia* olarak isimlendirildi. Newsom ve Cros (1932)'un bu bakteri türleri üzerine yapmış oldukları çalışmalar neticesinde bazı bakterilerin L-arabinozu, ksiloz ve trehalozu fermente ettiklerini tespit etmişlerdir. Özellikle L-arabinoz ve trehaloz fermentasyon özelliklerine göre sırasıyla biyotip A ve T olmak üzere iki biyotipe sahip oldukları ve bu özellikte olan bakterilerin *P. haemolytica* olarak yeniden isimlendirilmesi gerekliliğini birçok araştırmacı yaptığı çalışmalarla ortaya koymuştur (Biberstein ve ark., 1960; Biberstein ve Gills, 1962;

Angen ve ark., 1999; Angen ve ark., 2002). Daha sonra yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile *P. haemolytica* biyotip A, 1999 yılında yeniden yapılan taksonomik çalışmada *Pasteurella* cinsinden ayrılarak Pasteurellacea familyası içerisinde, Pasteurellacea sınıflandırılması üzerine önemli katkıları bulunan Walter Mannheim'e ithafen *Mannheimia* cins ismi altında yeni bir tür olarak tanımlandı (Angen ve ark., 1999). Trehaloz fermente eden *P. haemolytica* biyotip T ise, önce *P. trehalosi* olarak ayrı bir tür, daha sonra da 2007 yılında *Biberstenia trehalosi* ismi ile yeni ve ayrı bir cins olarak revize edildi (Blackall, 2007; Mohamed ve Abdelsalam, 2008; Rice ve ark., 2008; Hounsome, 2012).

M. haemolytica'nın serotiplendirilmesinde kapsüller yüzey antijenlerine yönelik olarak yapılan indirekt hemagglütinasyon ve çabuk lam agglütinasyon testleri kullanılmaktadır (Biberstein ve Gills, 1962). Biberstein ve ark. (1960) tarafından ilk olarak yapılan indirekt hemagglütinasyon testi serotiplendirmede en yaygın kullanılan yöntemdir. Serotiplendirme ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda *M. haemolytica*'ya ait 12 serotip (1,2,5,6,7,8,9,12,13,14,16,17) ve *Biberstenia trehalosi*'ye ait 4 serotip (3,4,10,15) olduğu tespit edilmiş, serotip 11'in ise *Mannheimia* cinsi içerisinde bir tür olan *M. glucosida* olarak isimlendirilmiştir (Younan, 1995; Angen ve ark., 1999; Highlander ve ark., 2001; Omaleki, 2012).

Mannheimia cinsi içerisinde önceleri en önemli tür olan ve özellikle ruminantların solunum sistemi enfeksiyonlarında primer ve sekonder etken olarak bulunabilen *M. haemolytica* yer almaktaydı. Daha sonra Angen ve ark., (1999) tarafından yapılan taksonomik çalışmada biyotiplendirme, ribotiplendirme, DNA-DNA hibridizasyon, 16S rRNA sekans çalışmaları ve multilokus enzim elektroforez çalışmaları neticesinde, *Mannheimia* cinsi içerisinde *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. varigena* ve *M. ruminalis* olmak üzere 5 tür tanımlandığı bildirilirken, taksonomide tanımlanmayan yeni türlerin de olabileceği bildirilmiştir. Christensen ve ark. (2011) tarafından otitis media ve konjunktivitli genç domuzlarda yapılan bir çalışmada izole edilen *Mannheimia* cinslerinin 16S rRNA sekans analizi sonucunda bu cins içerisinde *M. caviae* isminde yeni bir tür tanımlandığı bildirilmiş, daha sonra Hadjadj ve ark. (2015) tarafından deri apsisi bulunan bir insandan alınan örnekten izole edilen etken ile yapılan tüm genom sekans analizi, Matrix-assisted laser

desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein analizi ve 16S rRNA sekans analizi çalışmasında yeni bir *Mannheimia* türü tanımlandığı ve *M. massilioguelmeansis* olarak adlandırıldığı bildirilmiştir.

2.1.2. *Mannheimia haemolytica*'nın morfolojik ve kültürel özellikleri

M. haemolytica Gram negatif, hareketsiz, $\sim 0.5 \times 1.2$ μm boyutunda, endospor oluşturmeyen, küçük çomak veya kokobasil şekilli kapsüllü bir bakteridir. Gram boyama yöntemiyle boyandığı zaman bipolar boyanma özelliği gösterebilmektedir. Fakültatif anaerobik veya mikroaerilik (%5-10 CO₂) ortamda 37 °C'de kan veya serum ilave edilmiş besi yerinde iyi üreme yeteneğine sahiptir. Katı besiyerinde +4 °C'de 5-7 gün canlı kalabilmektedir. Uzun süreli stoklamalarda liyofilizasyon veya -80 °C'de, içerisinde gliserol, glikoz ve serum bulunan nutrient brothda saklanması tavsiye edilmektedir. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. D-sorbitol, D-ksiloz, D-mannitol, maltoz ve dekstrini fermente eder. Triple Sugar Iron (TSI) agarda glukoz, laktoz ve sükrozu fermente eder, fakat gaz ve H₂S oluşturmaz. Alkalın fosfataz ve nitrat redüksiyon testleri pozitifdir. Suşların ornitin dekarboksilaz, L-arabinoz, β -glukosidaz ve üreaz reaksiyonu negatifdir (Quinn, 2002; Mutter ve ark., 2015; Nefenchenko, 2018). Morris (1958) tarafından yapılan bir çalışmada %5 koyun kanı ilave edilmiş tryptose agar içeresine neomisin (1-5 $\mu\text{g/ml}$), novobiosin (2 $\mu\text{g/ml}$) ve actidione (100 $\mu\text{g/ml}$) ilave edildiğinde besiyerinin *M. haemolytica* ile infekte hayvanlardan ve kontamine materyallerden etkenin izolasyonu için selektif olarak kullanılabilceği bildirilmiştir.

M. haemolytica %5-7 defibrine sığır, koyun veya tavşan kanı ilave edilmiş agar besiyerinde 24-48 saat inkübasyon sonunda 1-2 mm çapında kenarları düzgün, smooth ve grimsi koloni oluşturur. Domuzlardan izole edilen suşların kolonileri daha küçük olmaktadır (Mutter ve ark., 2015). Etken rutin laboratuvar besi yerlerinin birçoğunda üreme yeteneğine sahiptir. Trypticase soy blood agar base, tryptose blood agar base ve %5 koyun kanı eklenmiş Columbia blood agar base gibi besi yerleri genellikle ilk izolasyonda sıklıkla kullanılmaktadır (Quinn ve ark., 2011). Etken buyyonda bulanıklık meydana getirerek ürer ve dipte tortu oluşturur. Suşların büyük çoğunluğu kanlı agarda hemoliz meydana getirir (Tomassini ve ark., 2009; Taunde ve ark., 2019). Hemoliz büyüklüğü besi yerinde kullanılan kanın orjinine göre değişkenlik gösterebilmektedir

(Mutter ve ark., 2015). *M. haemolytica*'nın MacConkey agarda üreme yeteneği değişkenlik göstermektedir (Bisgaard, 1977; Angen, 1999; Mutter ve ark., 2015).

2.2. *Mannheimia haemolytica*'nın Neden Olduğu Enfeksiyonların Patogenezi

M. haemolytica'nın patogenezi ve virülens faktörleri ile ilişkili çalışmaların büyük çoğunluğu serotip A1 üzerine yoğunlaşmıştır (Mutter ve ark., 2015). Etken dünya genelinde evcil ruminantların solunum yolu mukozalarında kommensal olarak yaygın şekilde bulunmaktadır (Adamu, 2007). Evcil ruminantlarda pnömoni vakalarında primer bakteriyel etken olarak sıklıkla izole edilmesi yanında, koyunlarda mastitis, üç aydan küçük kuzularda septisemi ve pnömoni, sığırlarda septisemi ve abort vakalarında, tavuklarda da pnömoni olgularından izole edilmiştir (Adamu, 2007; Quinn, 2011; Omaleki, 2012; Setta, 2017; Umar, 2018). Ayrıca insanda endokarditis, pnömoni, beyin apsesi, üriner sistem enfeksiyonu ve bir bebekte septisemiye neden olduğu bildirilmiştir (Punpanich, 2012; Ahmed, 2017).

M. haemolytica üzerine yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu hayvanlarda üst ve alt solunum yollarında meydana getirdiği patolojik bozuklukları üzerine yoğunlaşmaktadır (Yavrucu, 2008). Solunum sistemi, müköz membran bir tabakayla kaplı olduğundan mukoid özellikte salgı üretebilmektedir. Farinks aracılığıyla üst solunum yolunda bulunan siliar epitel hücrelerin hareketi ve mukoid salgı ile birlikte kommensal *M. haemolytica* etkenleri rumene doğru hareket ettirilir ve mide asidinin etkisiyle inaktive olur. Bu muko-siliar temizlik mekanizmasının olumsuz çevre şartları (sütten kesme, kötü hava koşulları, transport, yem değişikliği ve yetersiz beslenme, sürüye farklı hayvanların girişi vs.), virüsler (*Parainfluenza Virus 3*, *Bovine herpesvirus 1*, *Respiratory Syncytial Virus*, *Lentivirus*, *Reovirus*) ve diğer bazı bakteriler (*P. multocida*, *Mycoplasma* spp., *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp.) tarafından bozulması sonucu üst solunum yollarında *M. haemolytica* etkenlerinin çoğalmasına neden olurlar. Daha sonra bakteri yüzeyinde bulunan dış membran proteinleri ve yüzey lipoproteinleri aracılığıyla etken bronşlardaki epitel hücrelerde kolonize olur. Antifagositik özelliğe sahip kapsül sayesinde nötrofil ve makrofaj fagositozundan kurtulan bakteri, nazo-farinksden akciğere geçerek pnömoni tablosunu meydana getirir (Ahmed, 2003; Yavrucu, 2008).

M. haemolytica tarafından oluşturulan pnömoni vakaları akut kranio-ventral fibrinöz pnömoni ve fibrinopurulent plöra pnömoni ile karakterizedir (Confer, 2009). Makroskobik olarak akciğerlerin kesit yüzeyi mermerimsi ve loblar gri-kırmızı renkte görünür. Bütün loblarda hemoraji ve koagülasyon nekrozu belirgindir. İnterlobuler septum genellikle fibrinden zengin ödem sıvısı ile doludur. Histolojik olarak, alveoller değişken derecede nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu ve fibrin yönünden zengin eksudat ile doludur (Aitken, 2007; Rice ve ark., 2008; Confer, 2009).

M. haemolytica infeksiyonlarının bazılarında klinik olarak hiçbir belirti göstermeden ölüm meydana gelebilir. Akut pnömoni vakalarında klinik olarak, durgunluk, solunum güçlüğü, 40.6°C'den yüksek ateş, değişken derecede hızlı solunum, oskültasyonda solunum seslerinin anormal olmasının yanında, nazal ve oküler akıntılar sıklıkla görülen belirtilerdir. Subakut ve kronik pnömoni vakalarında ise klinik belirtiler akut belirtilerden daha az belirgin olarak ortaya çıkmaktadır (Aitken, 2007).

M. haemolytica'nın konak savunmasından kaçmasına ve kolonize olmasına olanak tanıyan ve hastalık patogeneğinde önemli rol oynayan birçok virülens faktörüne sahiptir. Bu faktörler arasında yapılan çalışmalarda tespit edilen adhezinler, kapsüller polisakkarit, dış membran proteinleri, lipopolisakkarit, nörominidaz, lökotoksin, lipoprotein, sialoglikoproteaz, serotip-spesifik protein ve transferrin bağlayan proteinler birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Lo, 2001a; Highlander ve ark., 2001; Zecchinon ve ark., 2005; Rice ve ark., 2008; Singh ve ark., 2018;).

2.3. *Mannheimia haemolytica*'nın Virülens Faktörleri ve Genleri

2.3.1. Kapsül

M. haemolytica kapsüller polisakkarit yapısı, β 1-4 bağı ile bağlı *N*-asetilmannozaminüronik asit ve *N*-asetilmannozamin'in oluşturduğu disakkaritin tekrarlamasından meydana gelmektedir. Kapsüller polisakkaritin biyosentezinde Uridine-5'-Triphosphate (UDP) *N*-acetyl-2-Epimeraz ve UDP-*N*-asetilmannozamin-dehidrogenaz enzimlerini kodlayan *mmaA* ve *mmaB* genlerinin rol aldığı bildirilmiştir (Adamu, 2007). Bakteri üreme döneminin logaritmik faz aşamasında kapsül oluşumu

fazla iken duraklama döneminde daha azdır. Kapsüller polisakkaritin kimyasal yapısı serotip 1,2 ve 6 üzerine yapılan çalışmalar üzerine yoğunlaşmıştır (Singh, 2011).

M. haemolytica'nın kapsüller polisakkarit yapısı solunum sisteminde adhezyon ve kolonizasyonu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca antifagositik etki ile nötrofil ve makrofaj fagositozunun engellenmesi yanında, komplement lizisinin inhibisyonuna karşı bakteriyi koruyan önemli bir virülens faktördür (Lo ve ark., 2001b; Yavrucu, 2008). Bazı izolatlarda kapsüller polisakkarit yapısının bulunmadığı bildirilmiştir. Kapsül bulunmayan mutant *M. haemolytica* etkenlerinin kapsüller suşlardan çok daha kolay fagosite edildiği ve akciğerlerde pulmoner surfaktan ile interaksiyonu sonucunda etkenin kolonizasyon yeteneğinin zayıfladığı bildirilmiştir (McKerral, 2002; Adamu, 2007).

M. haemolytica kapsüller polisakkarit antijen tipine göre A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 ve A17 olmak üzere 12 farklı serotipe sahiptir. Serotip A1, A2 ve A6'nın tüm dünyada sığır ve koyunların üst solunum yollarında yaygın olarak bulunduğu ve konakçı türleri ile serotipler arasında bir ilişkinin olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Al-Ghamdi ve ark., 2000; Hauglund ve ark., 2015; Klima ve ark., 2017). Sağlıklı sığırların nazofarengiyal bölgelerinden serotip A1, A2 ve A6 sıklıkla izole edilen serotiplerdir. Serotip A7, A9 ve A12'nin neden olduğu vakalar bildirilse de sığırların solunum yolu hastalıklarında serotip A1 ve A6 en önemli serotipler olarak kabul edilmektedir (Yavrucu, 2008; Klima ve ark., 2017; Garcia-Avarez ve ark., 2018). Koyunlarda ise A2 serotipi solunum yolu hastalıklarında en yaygın serotip olarak bulunurken serotip A5, A6 ve A7 serotiplerinin prevalasının da yüksek olduğu belirtilmiştir (Rice ve ark., 2008). Kapsül yapısı dışında lipopolisakkarit yapıları ve dış membran proteinlerine göre serotip A1 ve A6'nın benzerliklerinin yüksek olduğu ifade edilmiştir (Zecchion ve ark., 2005). Ülkemizde koyunlarda yapılan münferit çalışmalarda ise A2, A1 ve A6 serotiplerinin en fazla bulunan serotipler olduğu bildirilmiştir (Kırkan, 2003; İlhan ve Keleş, 2007)

2.3.2. Lipopolisakkarit

M. haemolytica lipopolisakkarit kompleksinin biyosentezinde klonlanmış ve karakterize edilmiş 2 gen bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar *lic2* ve *lpsA* olarak adlandırılan

gen bölgeleridir. *lic2*, *Haemophilus influenzae* lipopolisakkarit gen bölgesine benzeyen bir peptid yapıyı kodlayan ve 263 amino asitten oluşan gen bölgesiyken, *lpsA* çekirdek oligosakkarid biyosentezinde gerekli olan glikosiltransferaz genini kodlayan bir gen bölgesidir (Highlander, 2001). *M. haemolytica* lipopolisakkaritinin molekül yapısı oligosakkarid bölgelerin tekrarından oluşmuş polisakkarid yan zincir (O antijen), lipid A ile düşük moleküler ağırlığa sahip çekirdek oligosakkarit bölgelerden olmak üzere üç farklı yapıdan meydana gelmektedir. Lipid A yüksek ateş ve hipotensif şoka neden olan endotoksin üretir. O antijeni immunojenik ve farklı serotipler arasında kros reaksiyon meydana getirerek antikor oluşumuna neden olmasına rağmen, pnömoninin oluşumuna karşı konakçının korunması ve lipopolisakkarite karşı yüksek antikor yanıtı arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (Singh ve ark., 2011). Lipopolisakkarit kompleksi bakteri kuru ağırlığının %10-25'ini oluşturmaktadır (Yavrucu, 2008). Lipopolisakkarit kompleksinin yapısal ve antijenik özelliği incelendiğinde *M. haemolytica*'nın rough (çekirdek oligosakkarit ve Lipid A) ve smooth (çekirdek oligosakkarit, Lipid A ve O antijen) koloni tipinde, *Biberstenia trehalosi*'nin ise smooth koloni tipinde bir lipopolisakkarite sahip olduğu bildirilmiştir (Adamu 2007). Ali ve ark. (1992) tarafından koyun ve sığırlardan elde edilen *M. haemolytica* izolatlarının lipopolisakkarit bazlı heterojenitelerini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada, indirekt hemagglütinasyon yöntemini kullanarak 23'ünü serotip A1, 7'sini serotip A2, 1'ini serotip T4, 1'ini serotip T10 olmak üzere toplam 30'unu *M. haemolytica*, 2'sini *Biberstenia trehalosi* ve 8'inin indirekt hemagglütinasyon negatif olduğu, toplam 40 izolatın lipopolisakkarit profillerini de sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ve western blotting yöntemiyle incelediklerinde 10 farklı lipopolisakkarit tipi tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

M. haemolytica lipopolisakkariti, direk hücre lizisine, koagülasyon artışına, komplement aktivasyonuna, sitokin sentezini arttırarak lökositlerin yangı bölgesine gelmesine ve konakçıda β 2-integrin-lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen-1 (LFA-1) lökotosin reseptör ekspresyonuna sebep olarak bakteri tarafından akciğerlerde lökotosin salınımına neden olan önemli virülens faktörlerine sahip olduğu ortaya konulmuştur (Highlander, 2001; Singh ve ark., 2011).

2.3.3. Adhezinler

M. haemolytica adhezinleri, konakçının nazofarinks ve tosillerinde bulunan epitel hücre yüzeyindeki reseptör moleküllerine bağlanarak kolonizasyona sebep olurlar. Bakterinin konakçı hücreye kolonizasyonunun büyük kısmı fimbrialar tarafından olur (Adamu, 2007). *M. haemolytica* da bulunan fimbria, tip IV pili, bakterinin genomunda lokus *pilABCD* tarafından kodlanan gen bölgelerini içeren ve bazı bakteri türlerinde (*Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp.) de benzer şekilde adhezyonu sağlayan fimbriaların sentezinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. *pilC* sığırlarda serotip A1 ve A2 genomunda bulunurken, koyunlarda serotip A2'de tespit edilmiştir. Koyunlarda bulunan *pilC*'nin epitel hücrelere bağlanırken, konakçı türüne göre modifiye olabileceği ve başka konakçılara da bağlanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca tip IV pili'nin adhezyon dışında bakterilerde DNA alımı ve harekette de görev aldığı bildirilmiştir (Hounscome, 2012).

Fimbria dışında De la Mora ve ark. (2006), tarafından *M. haemolytica*'nın kültüre edilmiş trahea hücrelerine bağlanmayı sağlayan 68 kDa'luk adhezyon molekülüne sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu adhezyon molekülü nötrofiller üzerindeki 165 kDa'luk glikoprotein molekülüne bağlanır ve oksidatif patlamaya neden olur. Bunlar dışında fimbria üzerinde bulunan putative adhezyon molekülünün, epitel hücrelerde sialoglycoprotein reseptörüne bağlandığı belirtilmiştir (Lo ve ark., 2001a; Singh ve ark., 2011).

M. haemolytica, salgıladığı nöraminidaz enzimi ile mukus içerisindeki karbonhidrat ve proteini indirgediği, böylece epitel hücrelere adhezyonunu arttırıp patojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Ahmed, 2018). Retzer ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada *M. haemolytica* dış membran proteinlerinden transferrin bağlayan protein A ve B (*tbpA* ve *tbpB*)'nin adhezyon molekülü olarak görev yapabileceğini bildirmişlerdir. *M. haemolytica*'nın yüksek moleküler ağırlıklı (304 kDa) bir adhezyon molekülüne sahip olduğu, bunun yanısıra serotip spesifik antijen olarak isimlendirilen ve bakteri tarafından sentezlenen bir proteinin de kolonizasyonda görev aldığı belirtilmiştir (Highlander, 2001).

2.3.4. Dış membran proteinleri (OMP) ve lipoproteinler

Dış membran proteinleri (OMP) ve lipoproteinlerin konakçıda, yüksek oranda antikor sentezine neden olarak önemli koruyucu antijenik özelliğe sahip olduğuna inanılmaktadır. Bu antijenlere karşı gelişen antikorların fagositozu arttırdığı ve komplement sistemini aktive ettiği için aşı çalışmalarında önemli olduğu bildirilmiştir (Adamu, 2007). Pandher ve ark. (1998) proteaz muamelesi ve Western blotting tekniği ile 21 farklı immunojenik dış membran proteinini tanımlamışlardır. OMP'ler, serotipler arasında değişkenlik gösterebilmektedir. *M. haemolytica*'nın majör dış membran proteini ompA olarak bildirilmiştir. *OmpA* gen profili, sığır ve koyunlarda konakçı türüne göre çok fazla farklılıklar içerebilmektedir. 31 *M. haemolytica* izolatu ile karşılaştırmalı nükleotid sekans analizinin yapıldığı bir çalışmada (Highlander, 2001), birbirinden farklı dört gen bölgesinin tespit edildiği bildirilmiştir. *OmpA*'nın rolü tam olarak bilinmemesine rağmen, konakçı adhezyonunda, besin maddesinin transportunda ve membran bütünlüğünün korunmasında aktivite gösterdiği düşünülmektedir (Highlander, 2001; Hounscome, 2012).

M. haemolytica, dış membran proteinleri ile ilişkili 19-45 kDa arasında değişen büyüklükte en az beş lipoprotein üretmektedir (Highlander, 2001). Bu lipoproteinlerden üç tanesi *plpABC* olmak üzere bir operon modelinde bakteri kromozomunda tanımlanmıştır. Bu operon modeli 28 ile 30 kDa ağırlıkları arasında üç adet dış membran lipoprotein oluşumunda görev almaktadır. *plpA*'nın *in vitro* olarak sığırların epitelyal hücrelere bağlanma yeteneğinde olduğu ve bakteri yüzeyinde bulunduğu belirtilmiştir (Kisiela ve Czuprynski, 2009). *plpD* geni bakteri kromozomunda *plpABC* operonunun dışında başka bir bölgede bulunan ve 31 kDa'luk lipoprotein sentezinde görevli olan gendir (Hounscome, 2012). Bu proteinin fonksiyonu tam olarak belirlenememesine rağmen kültür süpernatant aşısı ile yapılan aşılama sonucunda buzağılarda serumda tespit edilmiştir. *plpE* geni ise *plpABC* operonu ve *plpD* dışında bakteri kromozomunun farklı bir parçasında lokalize olmuş ve 45 kDa'luk bir dış membran lipoproteini üretilmesinden sorumludur. Bu lipoprotein, *M. haemolytica*'nın bütün serotiplerinde bulunmaktadır (Hounscome, 2012). *M. haemolytica*'nın dış membran lipoproteini *plpE* ile ilgili yapılan aşı çalışmalarında, immün sistemin uyarılarak antikor yanıtını ve komplement sisteminin aktivasyonunu arttırdığı

bildirilmesine rağmen, *plpE*'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (Nardini ve ark. 1998; Confer ve ark. 2003). Bunlar dışında *M. haemolytica* kaynaklı pnömoni vakalarında yüksek antikor titresi meydana getiren ve hastalık sırasında *in vivo* olarak sentezlenen *gs60* dış membran lipoproteinine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu lipoprotein fonksiyonu hakkında literatürlerde çok az bilgi olmakla birlikte bütün serotiplerde bulunabileceği ve yüksek antikor sentezine neden olduğu ifade edilmiştir (Lee, 2008; Hounsome, 2012; El Dokmak, 2015).

M. haemolytica dış membran proteinlerinden bir diğeri de ilk olarak sığır serotip A1'de identifiye edilen serotip spesifik antijen 1 olarak da isimlendirilen dış membran proteindir (Lo ve ark., 1991). Yapılan bir çalışmada serotip spesifik antijen geninin serotip A8 dışında *M. haemolytica*'nın bütün serotiplerinde bulunabileceği ortaya konmuştur (Gonzalez ve ark., 1991). Serotip spesifik antijen proteininin *M. haemolytica* kaynaklı pnömoni vakalarında hasta sığırların akciğerlerinde serotip A1'in spesifik bir adhezyon molekülü olarak görev alabileceği de belirtilmektedir (Hounsome, 2012).

M. haemolytica çok sayıda demir düzenleme dış membran proteinleri üretmektedir (Adamu, 2007). Bunlardan *tbpA* ve *tbpB* en önemli proteinler olarak bilinmesinin yanında fonksiyonları tam olarak anlaşılamamış 77 kDa'luk proteinlerin de bulunduğu bildirilmiştir (Highlander, 2001). *M. haemolytica* üremesi için gerekli olan demiri üretemediği ve transport edemediği için bakteride demir metabolizmasının düzenlenmesi demir düzenleme dış membran proteinleri tarafından gerçekleşmektedir (Singh ve ark., 2011). Demir bağlayıcı proteinlerin nötrofillerin ve makrofajların fagositozunu inhibe edebildiği bildirilmiştir (Jeyaseelan ve ark., 2002).

2.3.5. Hücre dışı enzimler ve toksinler

Nörominidaz

M. haemolytica'nın bütün serotiplerinde 150 ile 200 kD ağırlığında nörominidaz enzimi tespit edilmiştir (Highlander, 2001). Bakterinin sabit büyüme döneminde maksimum olarak sentezlenen bu enzim, ısının etkisiyle değişikliğe uğrayabilmektedir (Straus ve ark., 1998). Bu enzimin konakçının mukozal yüzeyine kolonizasyonda ve sialik asidin modifikasyonunda görev aldığı bildirilmiştir (Adamu, 2007; Hounsome,

2012). Nörominidaz enzimi *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* gibi bakterilerin patogenezinde virülens faktörü olarak da önemli rol aldığı belirtilmektedir (Yavrucu, 2008).

Glikoproteaz

M. haemolytica'nın bütün serotipleri glikoproteaz genine ve aktivitesine sahiptir. Glikoprotez konakçı tarafından üretilen mukozal sialoglikoproteinlerini parçalamasının yanısıra selektif olarak IgG1'i hidrolize eder ve böylece opsonizasyonu azaltarak bakteri ölümünü azaltır (Mohamed ve Abdelsalam, 2008; Singh ve ark., 2011). Bu enzim *M. haemolytica*'nın konakçı hücresinde adhezyonu arttırmasına ek olarak trombositlerin aktive olmasına ve alveollerde birikimine neden olabildiği bildirilmektedir (Hounsoume, 2012).

İmmunglobulin proteaz

Solunum sistemi patojenlerinin bazıları (*Haemophilus influenzae* ve *Actinobacillus pleuropneumonia*) salgılanan antikoru parçalayacak proteazlar salgılamaktadır. Bu proteazlar monomomerik IgA'nın Fab ve Fc bölgelerini parçalayan serin endopeptidazlardır (Highlander, 2001). Etkenin lokalize olduğu bölgede IgA'ların eliminasyonu sonucu bakteriyel kolonizasyon artmaktadır. *M. haemolytica* izolatlarında IgA proteaz aktivitesi tam olarak tanımlanmamışken yapılan bir çalışmada (Lee ve ark., 1996), kısmen IgG spesifik proteaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. *M. haemolytica*'nın draft genome sekans analizi sonucunda IgA proteaz gibi proteinleri kodlayabilen 1503 ve 1398 kodonun olduğu da rapor edilmiştir (Highlander, 2001).

Lökotoksin

M. haemolytica'nın ruminant pnömonilerinde meydana gelen lezyonlara sebep olan en önemli virülens faktörü, ısıya duyarlı, oksijen, pH değişimlerine dayanıklı ve suda çözünebilen lökotoksindir (Chang ve ark., 1986; Shewen ve Wilkie, 1988; Gürbüz, 2003; Rice ve ark., 2008; Singh ve ark., 2011). Lökotoksin bütün serotipler tarafından salgılanmasına rağmen, miktarı ve biyolojik aktivitesi yönünden serotipler arasında farklılıklar vardır (Rice ve Ark., 2008). Bu toksin, "Repeats in toxin" ailesinin bir üyesi olan ve Gram negatif bakterilerde por oluşumuna neden olan ekzotoksinlerin bulunduğu

toksinler arasında yer almaktadır. ‘‘Repeats in toxin ailesi’’, *M. haemolytica*, hemolitik *Escherichia coli* suşları, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Neisseria meningitidis* ve *Serratia marcescens* bakterileri tarafından sentezlenen gen bölgeleri tanımlanmış 16 protein yapıda toksin içermektedir. Bu toksinler, hastalıkların patogenezisinde doku harabiyetine neden olan sitokinlerin salınımına neden olmasının yanısıra, kalsiyum bağımlı por oluşumu ile alveolar makrofajları, lökositleri ve monositlerin lize olmasına sebep olurlar (Yavrucu, 2008). Lökotoksin aktivitesi sonucu lize olan hücreler, akciğerlerde şiddetli yangısal reaksiyon sonucu alveollerde belirgin nekrozlar meydana getirir. *M. haemolytica* tarafından sentezlenen lökotoksini trombositleri lize ederek fibrin eksudasyonu ve trombus oluşumuna neden olduğu için lezyonlara katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Mohamed ve Abdelsalam, 2008; Yavrucu, 2008).

M. haemolytica lökotoksin aktivasyonu, sentezi ve salgılanması için kromozomda tanımlı *lktC*, *lktA*, *lktB*, *lktD* olmak üzere dört geni içeren operon bölgesi tanımlanmıştır. Bu operon genler tarafından kodlanan polipeptidler sırasıyla 165, 953, 708, 478 aminoasit uzunluğunda ve 20, 102, 80, 55 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler (Rice ve ark., 2008). *lktA* geni yapısal toksini kodlarken, *lktC* geni toksin aktivasyonunda, *lktB* ve *lktD* genleri ise toksin salgılanmasında görevli polipeptidlerin oluşumunda görev almaktadırlar. Bakteriyel üreme ve lökotoksin operonunun ekspresyonu birlikte düzenlenir. Bu düzenlemede çevresel faktörler (demir eksikliği, sıcaklık gibi) lökotoksin promoterlerinin aktivitesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Jeyaseelan ve ark., 2002; Zecchinon ve ark., 2005; Rice ve ark., 2008)

M. haemolytica lökotoksininin, lipopolisakkarit ile birlikte kompleks bir yapıda olduğu durumlarda lökolitik aktivitesi artmaktadır (L1, 1999). Lipopolisakkarit, lökotoksinden uzaklaştırıldığında lökolitik aktivite görülmemekteyken, tekrar birleştirildiğinde sıfırın altında saklama koşullarından 37 °C’ye kadar yaklaşık 10 saat içinde yeniden lökolitik aktivite kazandığı belirtilmiştir (L1, 1999).

M. haemolytica’nın sığır epitel hücrelerinde lökotoksin aktivitesinin apoptotik etkisinin araştırıldığı bir tez çalışmasında, canlı *M. haemolytica* kültürü ve purifiye edilmiş lökotoksinin alveolar makrofajlar üzerinde ciddi oranda apoptotik etki meydana

getirdiğini fakat bu etkinin oluşumunun zaman ve doza bağımlı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca çalışmada *M. haemolytica* kaynaklı pnömoni patogenezisinde epitel hücre apoptozisinin rolü olmadığı belirtilmiştir (Yavrucu 2008).

2.4. *Mannheimia haemolytica*'nın İdentifikasyonu

2.4.1. Biyokimyasal özellikleri

M. haemolytica suşlarının konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle yapılan ön identifikasyonunda kanlı agarda koloni morfolojisi ve hemoliz oluşturma, Gram boyama, MacConkey agarda üreme, katalaz, oksidaz reaksiyonları incelenerek standart metotlara göre yapılmaktadır (Quinn ve ark., 2011). Fakat farklı konakçı türlerinde ve saha izolatlarında biyokimyasal özellikler değişkenlik gösterebilmektedir. Biyokimyasal özelliklerin değişkenlik göstermesi nedeniyle biyokimyasal identifikasyonun PCR ile doğrulanması gerekmektedir (Jaworski ve ark., 1998, Miller ve ark., 2013; Shanthalingam ve ark., 2014). *M. haemolytica* suşlarının konvansiyonel bakteriyolojik teşhisinde API 20E, Minitex gibi manuel kitler kullanılması bazı araştırmacılar tarafından güvenilir bulunmasa da, API 20E kitinin konvansiyonel karbonhidrat fermentasyon yöntemleriyle uyumlu olduğu bildirilmiştir (Ahmed ve ark., 2017).

Tablo 1. *M. haemolytica*'nın bazı biyokimyasal özellikleri (Mutters ve ark., 2015).

Biyokimyasal Özellik	<i>M. haemolytica</i>
Gram Boyama	–
Katalaz	+
Oksidaz	+
Hareket	–
İndol	–
MacConkey	d
Üreaz	–
Nitrat Redüksiyon	+
Sükroz	+
Arginin Dehidrolaz	–
D(+) Ksiloz	+
L (+) Arabinoz	–
Glukoz	+
D (–) Sorbitol	+
D (–) Mannitol	+
D (–) Fruktoz	+
ONPG	+
Trehaloz	–

M. haemolytica suşları arasında ksiloz, indol, arabinose, ornithine, cellobiose, beta-glucosidase aktiviteleri yönünden farklılıklar görülebilmektedir (Jaworski ve ark., 1998, Angen, 2002). Ahmet ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada keçilerden izole edilen *M. haemolytica* suşlarının tamamını indol pozitif olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Güler ve ark. (1996)'nın *M. haemolytica*'nın biotiplendirmesi üzerine yapmış oldukları çalışmada, izolatlar arasında arabinoz ve ksiloz fermentasyonlarında farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir. Arabinoz ve ksiloz fermentasyonunun tespiti için kullanılan indikatörün, reaksiyonda büyük rolü olduğu ve içerisinde indikatör olarak bromcreosol purple, bromthymol blue ve phenol red olan üç farklı test ortamı ile yapılan bir çalışmada, phenol red brothda salisilin, bromthymol blue bulunan besiyerinde ise arabinozun daha iyi fermente edildiği bildirilmiştir (Gürbüz, 2003). Ayrıca bazı *M. haemolytica* suşlarının kanlı agarda hemoliz yapmadığı da rapor edilmiştir (Onderka ve Wishart, 1988).

Sağlıklı/hasta koyun ve sığırlardan alınan nazal sıvı ve akciğer örneklerinin bakteriyolojik olarak incelendiği bir çalışmada (Barbour ve ark., 1997), hasta koyunların üst solunum yolunda en sık izole edilen bakterilerin *Moraxella* spp., *Pseudomonas pseudomallei*, *Erysipelothrix* spp. ve *P. multocida* olduğu, hasta sığırların üst solunum yolundan en sık izole edilen bakterilerin ise *M. haemolytica*, *Actinomyces* spp. ve *Pseudomonas aeruginosa* olduğu, akciğer örneklerinden ise daha çok *M. haemolytica*, *Trueperella pyogenes*, *P. ureae*, *Erysipelothrix* spp., *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* izole edildiği bildirilmiştir. Araştırmada hasta ve sağlıklı hayvanlardan elde edilen *M. haemolytica* izolatlarının trehaloz negatiflik oranının ise sırasıyla %47.1 ve %0 bulunduğu bildirilmiştir. Ahmet ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, keçilerden izole edilen *M. haemolytica* suşlarının indol pozitif olduğu rapor edilmiştir.

Bisgaard (1977) tarafından yapılan çalışmada traheadan izole edilen *M. haemolytica* suşlarının hepsinin hemoliz meydana getirdiği, oksidaz ve katalaz testlerinin pozitif olduğu, TSI agarda gaz oluşturmadan asit oluşturmasına rağmen Macconkey agarda üremedikleri, indol, metil red (MR), voges proskauer (VP), arabinoz ve eskülin reaksiyonlarının negatif olduğu ve laktöz fermentasyonunun değişken olduğu bildirilmiştir.

Umar ve ark. (2018)'nin belirttiğine göre, *M. haemolytica* izolatlarının kanlı agarda hemolizinin değişken olduğu, bütün izolatların oksidaz ve katalaz pozitif olduğu, MacConkey agarda üremediği, TSI agarda H₂S oluşturmadığı, MR, VP, indol, üre ve trehaloz reaksiyonlarının negatif olduğu rapor edilmiştir.

Taunde ve ark., (2019), tarafından pnömonili keçilerde yapılan bir çalışmada, izolatların %85'inin kanlı agarda hemoliz oluşturmadığı, bütün izolatların eskülin hidrolize ettiği, O-nitrophenyl-beta-D-galactoside (ONPG) reaksiyonunun negatif olduğu ve MacConkey agarda üremediklerini tespit etmişlerdir.

Tomassini ve ark. (2009)'nin Kaliforniya'da yabani ve evcil koyunlar üzerine yaptıkları bir araştırmada kanlı agarda hemoliz meydana getirmeyen *M. haemolytica* ve *Biberstenia trehalosi* izolatlarının olduğunu bildirmiş ve biyokimyasal özelliklerine göre 43 biovariant ve 11 biogrup tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. *M. haemolytica* izolatlarının genel olarak indol reaksiyonları negatif olduğu bildirilmiştir (Quinn ve ark., 2002; Hawari ve ark., 2008). *M. haemolytica*'nın biyotiplendirilmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada (Güler ve ark., 1996), suşlar arasında arabinoz ve ksiloz fermentasyonları yönünden farklılıklar olduğu bildirilmiştir. İlhan ve Keleş (2007) koyunlardan izole ve tanımlanmış 66 *M. haemolytica* suşunun arabinoz, ksiloz ve trehaloz fermentasyon özelliklerine göre 57'sinin biyotip A, 9'unun ise biyotip T olduğunu bildirmişlerdir.

2.4.2. Moleküler İdentifikasyon

M. haemolytica izolatlarının tanımlanması için konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerin dışında bakterinin virülensi ile ilişkili farklı genlere yönelik spesifik primerlerin kullanıldığı PCR yöntemleri geliştirilmiştir.

Pasteurellaceae ailesi içerisinde bulunan türleri biyokimyasal özelliklerine göre tanımlamak zor olduğu için tanımlanmasının moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekliliği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Mutters ve ark., 1989; Angen ve ark., 1999; Hassan ve ark., 2016; Rawat ve ark., 2019).

Kırkan (2003) *M. haemolytica*'nın patojenitesinde önemli olan lökotosin genine yönelik hazırlanan primerlerin kullanıldığı çalışmada PCR yöntemi ile *M.*

haemolytica'yı teşhis etmişlerdir. Alexander ve ark. (2008) *M. haemolytica* dışında diğer *Mannheimia* türlerinin de lökotoxin sentezleyebildiği ve lökotoxin genine yönelik olarak hazırlanan primerlerin diğer *Mannheimia* türleri ile kros reaksiyon verebileceği bildirilmiştir. *M. haemolytica*, *M. glucosida* ve *M. ruminalis* türlerinin teşhisi için yapılan multiplex PCR çalışmalarında lökotoxin 1, hypothetical protein, lökotoxin 2, 16S rRNA bölgelerin çalışmasında başlangıçta *Histophilus somni*, *P. multocida* referans suşları ile zayıf da olsa non-spesifik bantlar oluşturduğu tespit edilmiştir (Alexander ve ark., 2008).

Ahmet ve ark. (2017) Bağdat ve civarında fenotipik testler ile *M. haemolytica* olarak izole ettikleri 5 saha izolatının 16S rRNA ve 12S rRNA gen bölgelerine yönelik yapmış oldukları multiplex PCR ile doğrulanmıştır.

Özbey ve ark. (2004) Elazığ'da konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle identifiye ettikleri 8 adet *M. haemolytica* izolatını, *M. haemolytica* tip spesifik primer ile yapılan PCR ile doğrulamışlardır.

Kumar ve ark. (2015) pnömonili akciğerlerden alınan 12 doku örneğinden konvansiyonel bakteriyel yöntemlerle *M. haemolytica* izole ve identifiye etmişler, direk lezyonlu dokudan *M. haemolytica* tip spesifik primer ve *Rpt2* genlerine yönelik primer kullanılarak yapılan PCR yönteminde de, örneklerin hepsini *M. haemolytica* olarak tanımlamışlardır.

Singh ve ark. (2018) tarafından yapılan bir araştırmada *M. haemolytica* izolatlarının bütün serotiplerinde bulunan *M. haemolytica* tip spesifik ve methyltransferase enzimini kodlayan *Rpt2* genine yönelik yapılan konvansiyonel PCR işleminde konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle *M. haemolytica* olarak izole ettikleri 52 izolatın hepsinin *Rpt2* ve *M. haemolytica* tip spesifik primerler ile pozitif bulunduğunu belirlemişlerdir. *M. haemolytica* tip spesifik primer ile yapılan PCR yöntemlerinin diğer bazı araştırmacılar tarafından da *M. haemolytica*'nın identifikasyonu için uygun olduğu bildirilmiştir (Hawari ve ark., 2008; Legesse ve ark., 2018).

2.5. Antimikrobiyal Duyarlılık

Mannheimia ve *Pasteurella* cinsine karşı aşılama uygun görülse de, aşılamaya bağlı kesin bir koruma sağlanamamaktadır. Bu yüzden, antibiyotikler bu cinsler içerisinde bulunan bakterilerden kaynaklı infeksiyonların kontrolü ve tedavisi için vazgeçilmez araçlardır (Kehrenberg ve ark., 2001; Katsuda ve ark., 2009).

M. haemolytica izolatlarında antimikrobiyal maddelere karşı geçmiş yıllarda direnç yaygın olarak görülmüştür (Katsuda ve ark., 2009). Bu direnç oluşumunun nedenleri arasında geçmiş yıllarda hayvan yemlerine profilaktik veya gelişimi arttırması amacıyla antibiyotiklerin kontrolsüz olarak katılması sayılabilir (Highlander 2001; Schwarz ve ark., 2004; Esaki ve ark. 2005; Shin ve ark., 2005; Katsuda ve ark., 2009).

M. haemolytica'ya karşı antimikrobiyal direnç, yapılan çalışmalarda çeşitlilik göstermektedir. Diker ve ark. (1994) *M. hemolytica*'nın penisiline dirençli olduğunu tespit ederken, Rossmanith ve ark. (1991), saha çalışmalarından izole ettikleri 4 *M. haemolytica* izolatının penisiline duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Chang ve ark. (1986) yapmış oldukları bir çalışmada, serotip A1'in tetrasiklin ve streptomisine karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Allan ve ark. (1985) tarafından sığır akciğerlerinden izole edilen *M. haemolytica* suşlarının linkomisin ve streptomisine karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Diker ve ark. (2000) pnömonili koyun akciğerlerinden izole ettikleri izolatların tamamının kloramfenikol ve linkomisine karşı dirençli, ampisilin, penisilin ve oksitetrasikline karşı duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Erdağ ve ark. (1993) tarafından pnömonili sığır akciğerlerinden elde edilen izolatların ampisiline dirençli olduğunu saptamışlardır. Baysal ve ark. (1994), pnömonili kuzu akciğerlerinden izole ettikleri *M. haemolytica* suşlarının penisilin dışında diğer antibiyotiklere dirençli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kaya ve Kırkan (1999) pnömonili ve sağlıklı koyunların nazal akıntılarından izole ettikleri toplam 50 *M. haemolytica* izolatının ampisilin, penisilin, oksitetrasiklin ve eritromisine duyarlı, streptomisin, gentamisin ve kanamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Önat ve ark. (2010) hasta ve sağlıklı sığırların nazal boşluklarından izole ettikleri *M. haemolytica* izolatların tamamının florfenikole duyarlı, enrofloksasin, sülfamethaksazol+trimetoprim ve ampisiline %80, eritromisine %60 oranında duyarlı

olduklarını rapor etmişlerdir. Solmaz ve İlhan (2011) tarafından Van'da koyun akciğerlerinden izole edilen 21 *M. haemolytica* izolatının, %90.5'inin sülfamethaksazol+trimetoprim ve enrofloksasine, %76.1'inin eritromisin, kloramfenikol ve oksitetrasikline, %71.4'ünün gentamisine, %47.6'sının ampisilin/sulbaktama, linkomisin ve penisilin-G'ye duyarlı bulunduğunu ve çalışmada izole edilen *M. haemolytica* suşlarının tamamının kullanılan antibiyotiklerin hiçbirine tümüyle duyarlı bulunmadığını bildirmişlerdir. Tel ve Keskin (2010) tarafından pnömonili koyun akciğerlerinden izole edilen 30 *M. haemolytica* izolatında yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinde, tümünün sülfamethaksazol+trimetoprim ve norfloksasine, %30'unun amoksisiline, %97'sinin gentamisine, %90'ının eritromisine, %97'sinin streptomisine, %87'sinin tetrasikline, %60'ının ampisiline duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Berge ve ark. (2006) koyun ve keçilerin akciğer örneklerinden izole ettikleri 39 *M. haemolytica* izolatının tamamını ceftiofur, amoksisilin-klavulanik asit, florfenikol ve siprofloksasine duyarlı olarak tespit etmişlerdir.

2.6. Antimikrobiyal Direnç Genleri

M. haemolytica'da tanımlanan antimikrobiyal direnç genlerinin çoğu küçük plazmid ve transpozonlar gibi mobil genetik elementler ile ilişkilendirilmektedir (Kehrenberg ve Schwarz, 2001; Zecchinon ve ark., 2005; Klima ve ark., 2010). *Mannheimia* ve *Pasteurella* cinsi içerisinde karakterize edilen direnç determinantlarının çok azı kendine özgü olmasına rağmen çoğunun başka bakteriler tarafından horizontal yolla transfer edilen genler olduğu bildirilmiştir (Klima, 2010). *M. haemolytica* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık ve direnç genlerinin tespitine yönelik yapılan bir çalışmada oksitetrasikline dirençli olan suşların çoğunda *tetH* geninin olduğu fakat diğer tetrasiklin genlerinin (*tetB*, *tetG*, *tetK*, *tetL*, *tetM*) tespit edilmediği, tilmikosin ve tulatromisine orta dirençli olarak tespit edilen 4 izolatın sadece bir tanesinde *ermX* makrolid direnç geninin tespit edildiği, amoksisilin+klavulanik asite dirençli izolatların hiçbirinde beta-laktam direnç geni *bla_{ROB-1}* tespit edilmediği, ampisiline dirençli suşlardan sadece 2 tanesinin *bla_{ROB-1}* genine sahip olduğu rapor edilmiştir (Klima ve ark., 2010).

Michael ve ark., (2012) tarafından *M. haemolytica* ve *P. multocida* izolatlarının gamitromisin ve tildipirosine antimikrobiyal duyarlılığı ve makrolid direnç genlerinin

varlığı üzerine yapmış oldukları çalışmada, tildipirosine dirençli olan suşların hepsinde *erm42*, *msrE-mphE* makrolid direnç genleri tespit ettiklerini, gamitromisine dirençli olan izolatlarda ise *msrE-mphE* makrolid direnç genlerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Rose ve ark., (2012) *M. haemolytica* ve *P. multocida*'nın multiplex PCR ile makrolid direnç genlerinin tespitine yönelik yapmış oldukları çalışmada, suşları fenotipik olarak 3 gruba ayırmışlardır. Birinci grupta tilmikosin, tildipirosin, tulatromisin ve gamithromisinden yalnızca tek bir makrolide dirençli olan 5 *P. multocida* ve 6 *M. haemolytica* izolatında *erm42* makrolid geninin bulunduğunu, ikinci grupta tildipirosin, gamitromisin ve tulatromisine duyarlı olan 5 *P. multocida* ve 5 *M. haemolytica* izolatında *msrE* ve *mphE* genlerinin bulunduğunu fakat *erm42* makrolid direnç geninin bulunmadığını, üçüncü grupta ise tilmikosin, tildipirosin, tulatromisin ve gamithromisinin hepsine birden yüksek direnç bulunan 3 *P. multocida* ve 4 *M. haemolytica* izolatında *erm42*, *mphE* ve *msrE* genlerinin üçünün de bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmada *msrE* ve *mphE* genlerini, tulatromisin, gamitromisin ve tilmikosin direncinin MİK değerlerindeki artış ile ilişkilendirmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Sıvap örnekleri

Bu araştırmada materyal olarak Aralık/2017-Ocak/2019 tarihleri arasında Van İl merkez mezbahasında kesimi yapılan 138 sığır ve 173 koyunun nazo-farengiyal (NF) ve trake-bronşiyal (TB) bölgelerinden alınan toplam 622 sıvap örneği ile Van ilinde özel veteriner polikliniklerinde veteriner hekimler tarafından pnömoni teşhisi konulan 19 sığır ve 9 koyundan alınan NF sıvap örneği olmak üzere toplamda 650 adet sıvap örneği kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmada incelenen örneklerin kaynağı, hayvan türü ve sağlık/hastalık durumlarına göre dağılımı.

Hayvan Türü	Materyal Kaynağı	Hayvan Sayısı	Örnek sayısı	
			NF	TB
Sığır	Mezbaha/Sağlıklı	133	133	133
Sığır	Mezbaha/Hasta	5	5	5
Sığır	Saha/Hasta	19	19	–
Koyun	Mezbaha/Sağlıklı	133	133	133
Koyun	Mezbaha/Hasta	40	40	40
Koyun	Saha/Hasta	9	9	–
Toplam		339	339	311

–: Örnek alınmadı

3.1.2. Bakteri izolatları

Çalışmada incelenen sıvap örneklerinden izole ve identifiye edilen toplam 48 adet *M. haemolytica* izolatı kullanıldı.

3.1.3. Referans suş

Araştırmada referans suş olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu FINDIK tarafından (Dr. Laszlo Fodor, Department of Epizootiology, University of Veterinary Science, Budapest) sağlanan *M. haemolytica* suşu kullanıldı.

3.1.4. Besiyerleri

Alınan sıvap örneklerinden *M. haemolytica* izolasyonu ve ön identifikasyonunda Columbia blood agar base (Oxoid, CM 0331, İngiltere), MacConkey agar (Merck, 1.05465, Almanya), Triple sugar iron (TSI) agar (Merck, 1.03915, Germany), Sülfür-indol-motility (SIM) medium (Merck, 5470, Almanya) besiyerleri; izolatların ve bakteriyel genomic DNA izolasyonu için yapılan kültür işlemlerinde saklanması brain heart infusion (BHI) broth (Merck, 1.10493, Germany) besiyeri, antimikrobiyal duyarlılık ve MİK değerlerinin tespitinde ise Müller Hinton agar (HIMEDIA, M173, Hindistan) besi yeri kullanıldı.

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanan besiyerleri otoklavda (121 °C'de 15 dk) sterilize edildikten sonra kullanıldı. Kanlı agar ve kanlı Muller-Hinton agar hazırlamak için, 45-50°C'ye kadar soğutulan steril Columbia blood agar base ve Mueller-Hinton agar besiyerlerine %5-7 oranında defibrine koyun kanı eklendi.

3.1.5. Antibiyotik disk ve E-test stripleri

Araştırmada incelenen *M. haemolytica* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının tespitinde; eritromisin (15 µg Bioanalyse, 180324A, Türkiye), tilmikosin (15 µg Bioanalyse, 171206O, Türkiye), streptomisin (10 µg Bioanalyse, 180530G, Türkiye), gentamisin (10 µg Bioanalyse, 180618A, Türkiye), tetrasiklin (30 µg Bioanalyse, 180418C, Türkiye), penisilin-G (10 U Bioanalyse, 180103A, Türkiye), ampisilin (10 µg Bioanalyse, 180228B, Türkiye), ceftazidim (30 µg Bioanalyse, 180131C, Türkiye), sülfamethaksazol+trimetoprim (23,75/1,25 µg Bioanalyse, 181119A, Türkiye), enrofloksasin (5 µg Bioanalyse, 171212E, Türkiye) antimikrobiyal diskleri; izolatların MİK değerlerinin belirlenmesinde de; eritromisin (0.016-256 µg/ml Himedia, EM022, Hindistan), tilmikosin (0.002-32 mg/L Liofilchem, 92201, İtalya),

streptomisin (0.016-256 µg/ml Himedia, EM48, Hindistan), gentamisin (0.016-256 µg/ml Himedia, EM025, Hindistan), tetrasiklin (0.016-256 µg/ml-Himedia, EM056, Hindistan), penisilin-G (0.016-256 µg/ml Himedia, EM062, Hindistan), ampisilin (0.016-256 µg/ml Himedia, EM068, Hindistan), ceftazidim (0.016-256 µg/ml Himedia, EM012, Hindistan), sülfamethaksazol+trimetoprim (0.002-32 mg/L Liofilchem, 92123, İtalya), enrofloksasin (0.002-32 µg /ml Himedia, EM115, Hindistan) e-test stripleri kullanıldı.

3.1.6. Çalışmada kullanılan çözelti ve ayıraçlar

Fizyolojik tuzlu su (FTS): 8.75 gr NaCl, distile su içerisinde çözdürüldü ve 1 lt'ye tamamlandı (Lenette ve ark., 1985).

Kovaks ayıracı: Bakteri izolatlarının ön identifikasyonunda indol reaksiyonunu belirlemek amacıyla kullanıldı. Test için, 75 ml amil alkol içerisine 5 gr P-dimetil amino benzaldehid katıldı ve çözeltiliye yavaşça 25 ml HCl (Merck 1.0317.2500 (%37), Almanya) eklenerek karışım homojenize edildi (Lenette ve ark., 1985).

Oksidaz test şeritleri: Şüpheli bakteri izolatlarının oksidaz aktivitesini belirlemek amacıyla Microbact™ Oxidase Strip (Oxoid, MB0266A, Kanada)'leri kullanıldı.

Katalaz test ayıracı: Şüpheli bakteri izolatlarının katalaz aktivitesinin belirlenmesinde %3'lük hidrojenperoksit (H₂O₂, Merck, 1.08600.1000 (%35), Almanya) kullanıldı (Carter, 1984).

Tris-Acetat-EDTA (TAE) buffer: Real Time-PCR işleminden sonra amplikonların tespiti amacıyla uygulanan agaroz jel elektroforezinde %1'lik TAE buffer (Bioshop, TAE 222, Kanada) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıvap örneklerinin alınması

Çalışmada Van İli merkez mezbahasında kesimi yapılan hayvanların NF bölgelerinden alınan bilateral sıvap örnekleri ile birlikte, aynı hayvana ait akciğerlerin TB bölgesinden alınan sıvap örnekleri kullanıldı. Ayrıca özel veteriner klinik hekimlerince klinik olarak solunum sistemi enfeksiyonu belirtileri tespit edilen canlı

hayvanlardan alınan bilateral NF sıvap örnekleri, Stuart transport besiyerine konularak soğuk zincirde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına kısa sürede ulaştırıldı.

3.2.2. *M. haemolytica* izolatlarının izolasyonu

Sığır ve koyunlardan alınan sıvap örnekleri, içinde 3 ml steril FTS bulunan tüplere konuldu ve vortekste iyice karıştırılarak bakterilerin sıvı faza geçişi sağlandı. Santrifüj (Sigma, 111806, Almanya) işlemiyle (3000g x 10 dk) elde edilen sediment 0.1 ml steril FTS ile tekrar süspanse edildi. Elde edilen bakteri süspanسیونundan 20 µl alınıp %5-7 koyun kanlı agara inokule edildi. Besi yerleri aerobik ortamda 37 °C'de 24-72 saat süreyle inkübe edildikten sonra oluşan 1-2 mm çapında grimsi, şeffaf, düzgün, yuvarlak veya mukoid özellikteki hemolitik bakteri kolonileri şüpheli olarak kabul edildi ve identifikasyon işlemlerinde kullanılmak üzere saf kültürleri hazırlandı (Carter, 1984; Önat ve ark., 2010; Quinn ve ark., 2011)

3.2.3. *M. haemolytica* izolatlarının identifikasyonu

Biyokimyasal Testler

Ön İdentifikasyon

Araştırmada incelenen izolatların ön identifikasyonunda saf kültürlerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemiyle boyandı. Gram negatif ve kokobasil-küçük çomaklar şeklinde görünen kolonilere oksidaz ve katalaz testleri yapıldı. Her iki testle pozitif saptanan bakteriler standart biyokimyasal testler ile ön identifikasyonu yapıldı. Bu kapsamda, MacConkey agarda üreyen ve/veya üremeyen, TSI agarda dipte asit (sarı renk) oluşturan (fermentatif) ve SIM mediumda hareketsiz olduğu tespit edilen bakteri izolatları *M. haemolytica* şüpheli olarak kabul edildi (Angen ve ark., 2002). *M. haemolytica* şüpheli bakteri izolatları biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle identifiye edileceği zamana kadar %1 oranında maya ekstraktı eklenmiş %20 gliserinli BHI besiyeri ve boncuklu bakteri saklama tüplerinde (Or-Bak, 1210908, Türkiye) ayrı ayrı -70 °C'de saklandı (Bisgaard, 1977; Angen ve ark., 2002; Rensburg, 2004; Taunde ve ark., 2019).

Gram boyama ve hemoliz özelliğinin belirlenmesi

Hemoliz özelliğinin belirlenmesi amacıyla %5-7 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agar besiyerine ekim yapılarak, 37 °C'de 24-72 saat inkübasyon sonrasında oluşan bakteri kolonilerinin etrafında hemoliz oluşumu incelendi. Gram boyama ile boyanan preparatlarda pembe/kırmızı renkli görünen bakteriler Gram negatif olarak değerlendirildi (Lenette ve ark., 1985).

Oksidaz testi

İzolatlarda oksidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla oksidaz test stripleri [Microbact™ Oxidase Strips (Oxoid, MB0266A)] kullanıldı. Testte, üretici firmanın protokolüne göre, saf kültürden öze ile alınan tek bir bakteri kolonisi oksidaz stripe sürüldü ve 15-30 sn sonra sürüntü yerinde mavi-mor rengin görülmesi pozitif, renk değişiminin görülmemesi negatif olarak değerlendirildi (Quinn ve ark., 2011).

Katalaz testi

Test için, lam üzerine bir damla %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı. Daha sonra kanlı agardaki taze ve saf bakteri kültüründen bir öze dolusu bakteri kolonisi alınıp %3'lük H₂O₂ solüsyonuna değdirildiğinde hava kabarcığının oluşması pozitif, hava kabarcığının oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (Lenette ve ark., 1985).

MacConkey agarda üreme

Testte, taze ve saf kültürlerden öze ile alınan *M. haemolytica* şüpheli tek bir bakteri kolonisi MacConkey agara ekildi ve 37 °C'de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda besiyerinde bakteri kolonilerinin oluşup oluşmadığı değerlendirildi (Carter, 1984).

TSI agarda üreme

M. haemolytica şüpheli bakteri izolatlarının taze kültürlerinden iğne uçlu öze ile TSI agar besiyerine ekimleri yapıldı ve 37 °C'de 24-72 saatlik inkübasyon sonunda besiyerinin dip kısmında sarı renk (glikoz fermentasyonu), gaz ve kararma (H₂S oluşumu) oluşup oluşmadığı incelendi (Koneman ve ark., 1988).

SIM medium reaksiyonu (İndol ve hareket testi)

SIM mediuma ekimi yapılan *M. haemolytica* şüpheli bakteri izolatları 24-48 saat süreyle 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sadece ekim hattı üzerinde üremenin görülmesi hareket negatif, üremenin tüp çeperine doğru yayılması ise hareket pozitif olarak değerlendirildi. İndol oluşturan izolatların belirlenmesi amacıyla SIM besiyeri üzerine birkaç damla Kovaks ayırıcı damlatıldı ve besi yeri yüzeyinde kırmızı/pembe renkli bir halkanın oluşumu indol pozitif, herhangi bir renk değişiminin olmaması ise indol negatif olarak değerlendirildi (Carter, 1984; Koneman ve ark., 1988).

Real Time-PCR yöntemiyle identifikasyon

DNA izolasyonu: *M. haemolytica* şüpheli bakterilerin genomik DNA’sının elde edilmesinde ticari bakteri DNA izolasyon kiti (Cat# GF-BA-100, Vivantis, Malezya) kullanıldı. Bu amaçla, şüpheli bakteri kültürlerinden steril öze ile alınan tek bir koloni 3 ml BHI broth içerisine inokule edildi ve aerobik ortamda 24 saat süreyle 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Sıvı besiyerinde üreyen bakteri süspansiyonundan 1 ml alındıktan sonra steril endorflara aktararak 6000 x g’de 2 dk santrifüj (Sigma, 111826, Almanya) edildi. Süpernatant atıldıktan sonra elde edilen bakteri peleti üzerine 100 µl resüspansiyon buffer 1 eklendi ve mikropipet ile karıştırıldı. Hazırlanan süspansiyona 10 µl (50 mg/ml) lizozim eklendi ve mikropipet ile karıştırılarak 37°C’de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Süspansiyon santrifüj edildi (10000 x g’de 3 dk) ve süpernatant atıldı. Protein denatürasyonu amacıyla pelet üzerine 180 µl resüspansiyon buffer 2 ve 20 µl proteinaz K eklenmesinden sonra mikropipet ile karıştırıldı ve 20 dk süreyle 65°C’de çalkalamalı kuru banyoda (Euroclone, EMS100, Çin) bekletildi. Elde edilen süspansiyonda bulunan RNA’nın elimine edilmesi amacıyla 20 µl RNase A eklendi ve karıştırılarak 5 dk süreyle 37°C’de inkübe edildi. Karışıma 440 µl bakteriyel genomik DNA binding buffer’den eklendi ve homojenizasyonu sağlamak amacıyla endorflar birkaç kez ters düz yapıldıktan sonra 65°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı. 200 µl absolute etanol eklendikten sonra yüksek etanol konsantrasyonu nedeniyle dipte pelet oluşumunu engellemek için karışım hızlı bir şekilde vortekslendi. Hazırlanan süspansiyon kit içersinde bulunan koleksiyon tüplü spin kolona aktarıldı ve 10000 x g’de 1 dk santrifüj edilerek koleksiyon tüpünde bulunan sıvı atıldı. Spin kolon üzerine

650 µl wash buffer eklenerek 10000 x g'de 1 dk santrifüj sonrası sıvı kısım tekrar atılarak spin kolonun yıkama işlemi tamamlandı. Spin kolonda kalan etanolün de uzaklaştırılması amacıyla 10000 x g'de 1 dk santrifüj tekrarlandı. Son aşamada, DNA içeren spin kolonun yerleştirildiği yeni bir ependorf tüpüne, 100 µl elüsyon buffer ilave edildi. İki dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra, santrifüj işlemi (10000 x g'de 1 dk.) ile ependorf tüpüne aktarılan genomik DNA Real Time-PCR işlemlerinde kullanıldı.

Real Time-PCR: *M. haemolytica* suşlarının tür düzeyinde identifikasyonu, Hawari ve ark. (2008) tarafından bildirilen protokole optimizasyon yapılarak uygulandı. Real Time-PCR işlemlerinde, ticari SYBR Green qPCR Master Mix (Ampliqon (2X), 5000830, Danimarka) firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Buna göre; PCR karışımı hazırlanırken optimal koşulları sağlamak amacıyla 12 µl Master Mix içine 2 µl genomik DNA ve her bir primerden (Tablo 2) 1'er µl konuldu ve karışım PCR grade su ile 25 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım ön denatürasyon için önce Thermal cycler'da (Qiagen, Corbet Rotor Gene, 6000, ABD) 94°C'de 5 dk. süreyle bekletildi. Daha sonra 35 siklusu içeren amplifikasyon işleminde; 94°C'de 1 dk. denatürasyon, 56°C'de 45 sn. bağlanma, 72°C'de 1 dk. uzama ve ardından 72°C'de 5 dk süreyle final uzama protokolü uygulandı ve Real Time-PCR cihazının software yazılımında elde edilen dinamik sigmoidal eğriler pozitif olarak değerlendirildi. Amplifikasyon aşamasında elde edilen PCR ürünlerinin konfirmasyonu amacıyla gel-red katılmış %1'lik agaroz jelde (1xTAE çözeltisi içerisinde) bir saat süreyle uygulanan elektroforez (Owl Easycast, B1-BP, ABD) işleminden (70V-60A) sonra görüntüleme sisteminde (ImageSCI, GL 5000, ABD) incelendi. Tespit edilen ampliconlar 100 bp'lik DNA ladder (VC 100 bp plus, Vivantis, Malezya) ile karşılaştırıldı ve 325 bp'lik bant oluşturan izolatlar *M. haemolytica* pozitif kabul edildi. Referans *M. haemolytica* bakteri suşu pozitif kontrol, içinde DNA bulunmayan PCR grade su ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

Tablo 3. *M. haemolytica* spesifik oligonükleotid dizisi (Hawari ve ark., 2008).

Gen	Primer	Olinükleotid dizileri (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)
<i>PHSSA</i>	F	TTCACATCTTCATCCTC	325
	R	TTTTTCATCCTCTTCGTC	

3.2.4. Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi

M. haemolytica izolatlarının identifikasyonu ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde BDTM Pheonix otomatize bakteri identifikasyon sistemi (Becton Dickinson, Amerika) kullanıldı. Bu amaçla bakteri kültürlerinden alınan birkaç bakteri kolonisi, BD-PheonixTM ID Broth içinde süspansedilip yoğunlukları spektrofotometrik olarak (DEN-1B McFarland Densitometer, Grant-bio, İngiltere) McFarland 0.5'e ayarlandı. Hazırlanan ID Broth solüsyonu BD-PheonixTM ID Panele ilave edilip cihaza yerleştirildi ve 18-36 saatlik inkübasyondan sonra incelenen izolatların sonuçları değerlendirildi. ID Panelde bulunan 45 farklı biyokimyasal test (Tablo 4; Şekil 1) sonucunda elde edilen veriler ile *M. haemolytica* izolatlarının biyokimyasal özelliklerinde belirlenecek olası farklılıklara göre izolatlara yönelik değerlendirilmeler yapıldı (Laishevtcev, 2016).

Tablo 4. Biyokimyasal profillerin belirlenmesi amacıyla kullanılan biyokimyasal parametreler.

1. L-Fenilalanin-AMC	24. Üre
2. 4MU-N-Acetyl-BD-Glucosaminide	25. PNP-BD-Glucoside
3. L-Glutamik Asit-AMC	26. Beta-Allose
4. L-Triptofan-AMC	27. Malonate
5. L-Pyroglutamic Acid-AMC	28. Alpha-Ketoglutaric Acid
6. L-Prolin-AMC	29. Tiglic Acid
7. L-Arginin-AMC	30. N-Acetyl-Galactosamine
8. Arginin-arginin AMC	31. N-Acetyl-Glucosamine
9. Glisin-AMC	32. Sorbitol
10. L-Lösin-AMC	33. Sükroz
11. Lizin-Alanin-AMC	34. Galacturonic Acid
12. Glutaril-Glisin-Arginin-AMC	35. Maltulose
13. Glisin-Prolin-AMC	36. L-Rhamnose
14. Kolistin	37. Beta-Gentiobiose
15. Polimiksin-B	38. Dekstroz
16. D-Mannitol	39. D-Galaktoz
17. Sitrat	40. D-Fruktoz
18. Asetat	41. D-Gluconic Acid
19. Adonitol	42. D-Melibioz
20. L-Prolin-NA	43. L-Arabinoz
21. Gamma-L-Glutamil-NA	44. Methyl-B-Gluoside
22. BIS(PNP)-Fosfat	45. Ornitin
23. Eskülin	



Şekil 1. BD Phoenix™ Gram negatif bakteri identifikasyon paneli.

3.2.5. *M. haemolytica*'nın virülens ile ilişkili genlerinin tespiti

Çalışmada, *M. haemolytica* izolatlarında virülens ile ilişkili olan O-sialoglikoproteaz (*gcp*), dış membran lipoproteini (*gs60*), transferrin bağlayan protein (*tbpB*), lökotoksin (*lktC*), UDP-N-asetil-D-glikozamin-2-epimeraz (*nmaA*) ve adhezyon (*adh*) genlerinin varlığı Real Time-PCR yöntemiyle tespit edildi. Her bir virülens ile ilişkili gen için kullanılan oligonükleotid dizileri ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 5'de verildi (Klima ve ark., 2014).

Tablo 5. Virülens ile ilişkili genlerin oligonükleotid dizileri ve bağlanma sıcaklıkları (Klima ve ark., 2014).

Genler	Primer	Olinükleotid dizileri (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
<i>gcp</i>	F	CGCCCCTTTTGGTTTTCTAA	54
	R	GTAAATGCCCTTCCATATGG	
<i>gs60</i>	F	GCACATTATATTCTATTGAG	50
	R	AGGCATACTCTAACTTTTGC	
<i>tbpB</i>	F	CTACTTGCTGCTTGTTTCCTC	56
	R	AGAACCGCTTACTGTACGTC	
<i>lktC</i>	F	GGAAACATTACTTGGCTATGG	54
	R	TGTTGCCAGCTCTTCTTGATA	
<i>nmaA</i>	F	CTGTAGAAGCCGGAACAGTA	56
	R	CATCGCCATAAGGGTTGTGA	
<i>adh</i>	F	CTGCAAGTAAGGCAACATTG	54
	R	GAATCCGCACCAATAGCAAT	

Real Time-PCR işlemlerinde ticari SYBR Green qPCR Master Mix (Ampliqon, 5000830, Danimarka) kullanıldı. PCR karışımının optimizasyonu sonrasında, 10 µl Master Mix içine 2 µl genomik DNA ve her bir primerden (Tablo 4) 1'er µl ilave edildi ve karışım PCR grade su ile 20 µl'ye tamamlandı. Karışım, Thermal cycler'da (Qiagen, Corbet Rotor Gene, 6000, ABD) ön denatürasyon için 95 °C'de 5 dk. bekletildikten sonra, *adh*, *gcp*, *nmaA* ve *tbpB* genleri için 35 ve *gs60* ve *lktC* genleri için 40 siklusluk amplifikasyon işleminde; 94 °C'de 30 sn. denatürasyon, Tablo 4'de her bir gen için belirtilen sıcaklıklarda 60 sn. bağlanma, 72 °C'de 60 sn. uzama ve ardından 72 °C'de 8 dk. final uzama protokolü uygulandı ve Real Time-PCR cihazının yazılımında dinamik olarak elde edilen sigmoidal eğriler pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.6. Antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi

İncelenen izolatların makrolid grubundan eritromisin ve tilmikosine, aminoglikozid grubundan streptomisin ve gentamisine, tetrasiklin grubundan tetrasikline, β-laktam grubundan penisilin-G, ampisilin ve ceftazidime, sülfanamid grubundan sülfamethaksazol+trimetoprim ve kinolon grubundan enrofloksasine duyarlılıklarının belirlenmesinde Kirby-Bauer disk difüzyon (Bauer ve ark 1966) ve E-test yöntemleri (Sader ve Pignatari, 1994) kullanıldı. Antimikrobiyal maddeler seçilirken sahada özel klinik veteriner hekimleri tarafından solunum sistemi enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan antimikrobiyal maddelerin seçilmesine dikkat edildi.

Her iki test için önce kanlı agarda üretilen (37°C'de 24 saat) bakteri kolonilerinden birkaç tane alınarak 3 ml FTS içinde süspanse edildi ve hazırlanan süspanسیونun yoğunluğu spektrofotometrik (DEN-1B, V-2GW, McFarland Densitometer, Grant-Bio, İngiltere) olarak McFarland 0.5 standardına göre ayarlandı. Daha sonra Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2018) ve Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST, 2019)'te bildirilen standartlara göre 100 µl bakteri süspanسیونu, %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agar besiyerine aktararak dragalski çubuğu ile besi yeri yüzeyine homojen ve ince bir film tabakası oluşturacak şekilde yayıldı ve 10 dk oda ısısında bekletildi.

Disk difüzyon testinde, yukarıda belirtilen her bir antimikrobiyal madde için

temin edilen diskler, steril bir pens yardımıyla eşit aralıklarla ekimi yapılan petrilere yerleştirildi ve besi yerleri 37 °C’de 24 saat süreyle inkübe edildi. Testin sonunda her diskin çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları kumpas ile milimetrik olarak ölçüldü ve izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları CLSI (2002), CLSI (2018), EUCAST (2019) tarafından belirlenen kriterlere göre değerlendirildi.

İncelenen izolatların her bir antimikrobiyal madde için MİK değerlerinin tespiti amacıyla CLSI (2018) ve EUCAST (2019) standartlarına göre uygulanan E-test yönteminde ise, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan 100 µl bakteri süspansiyonu, %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agar besiyerlerine aktarıldı ve steril dragalski çubuğu ile besi yeri yüzeyine homojen ve ince bir film tabakası oluşturacak şekilde yayıldı ve 10 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra her bir antimikrobiyal madde için temin edilen e-test stripleri, bir petriye 2 adet strip birbirine paralel olacak şekilde yerleştirildi ve 37 °C’de 24 saat süreyle inkübe edildi. Testin sonunda her bir antibiyotik sribin etrafında oluşan inhibisyon zonunun en uç noktasında belirlenen sayısal değer, CLSI (2002), CLSI (2018), NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) (2009), EUCAST (2019) tarafından belirlenen kriterlere göre MİK olarak değerlendirildi.

3.2.7. Antimikrobiyal direnç genlerinin tespiti

M. haemolytica izolatlarında disk diffüzyon ve/veya e-test ile belirlenen MİK değerlerinin analizleri sonucunda CLSI (2002), CLSI (2018), EUCAST (2019) ve NARMS (2009) kriterlerine göre dirençli oldukları belirlenen bakteri izolatlarında antimikrobiyal maddelere karşı direnç genlerinin tespitinde Real Time-PCR yöntemi kullanıldı. Bu kapsamda, antimikrobiyal direnç ile ilişkili makrolid (*erm42*, *msrE*, *mphE*), tetrasiklin (*tetH*), beta-laktam (*bla_{ROB-1}*), aminoglikozid (*strA*) ve sülfanamid (*sulIII*) grubu antimikrobiyal maddelere karşı gelişen dirençte rol oynayan bazı direnç genlerinin varlığı incelendi (Tablo 6).

Bunun için, makrolid, tetrasiklin ve beta-laktam grubu genlerin tespitinde kullanılan Real Time-PCR karışımı, 10 µl SYBR Green qPCR Master Mix (Ampliqon, 5000830, Danimarka), 2 µl genomic DNA ve antimikrobiyal direnç geni spesifik primerlerin (Tablo 6) her birinden 1’er µl ve 6 µl PCR suyu olmak üzere toplam 20 µl;

aminoglikozid ve sülfanamid grubu antimikrobiyal direnç genlerinin tespitinde ise, 12 µl SYBR Green qPCR Master Mix, 2 µl genomic DNA ve antimikrobiyal direnç geni spesifik primerlerin her birinden 1'er µl ve 9 µl PCR suyu olmak üzere toplam 25 µl olacak şekilde optimize edildi. Her iki grup için hazırlanan karışımlar Real Time-PCR işleminin ön denatürasyon aşamasında 94 °C'de 5 dk. bekletildi. Toplam 35 siklus olarak gerçekleştirilen amplifikasyon aşamasında uygulanan Real Time-PCR protokoleri de her bir direnç geni için ayrı ayrı tablo 7'de verildi. Real Time-PCR cihazının yazılımında elde edilen dinamik sigmoidal eğriler pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 6. Antimikrobiyal direnç genlerinin tespitinde kullanılan oligonükleotid dizileri.

Antimikrobiyal Maddeler	Genler	Primer	Oligonükleotid Dizileri (5'-3')	Kaynaklar
Tetrasiklin	<i>tet(H)</i>	F	ATACTGCTGATCACCGT	Klima ve ark., 2014
		R	TCCCAATAAGCGACGCT	
β-laktam	<i>bla_{ROB-1}</i>	F	AATAACCCTTGCCCCAATTC	Klima ve ark., 2014
		R	TCGCTTATCAGGTGTGCTTG	
	<i>erm42</i>	F	TGCACCATCTTACAAGGAGT	Rose ve ark., 2012
		R	CATGCCTGTCTTCAAGGTTT	
Makrolid	<i>mphE</i>	F	ATGCCAGCATATAAATCGC	Rose ve ark., 2012
		R	ATATGGACAAAGATAGCCCG	
	<i>msrE</i>	F	TATAGCGACTTTAGCGCCAA	Rose ve ark., 2012
		R	GCCGTAGAATATGAGCTGAT	
Sülfanamid	<i>SulIII</i>	F	CAGTTTCTCCGATGGAGGCC	Kehrenberg ve Schwarz, 2001
		R	CTCGTGTGTGCGGATGAAGTC	
Streptomisin	<i>StrA</i>	F	TGACTGGTTGCCTGTCAGAGG	Kehrenberg ve Schwarz, 2001
		R	CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA	

Tablo 7. Antimikrobiyal direnç genlerinin tespitinde uygulanan Real Time-PCR protokolleri.

Genler	Ön Denatürasyon (°C / dk.)	Amplifikasyon (°C / sn.)			Final Uzaması (°C / dk.)
		Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	
Tetrasiklin					
<i>Tet(H)</i>	95/5	94/30	53/60	72/60	72/8
β-laktam					
<i>bla_{ROB-1}</i>	95/5	94/30	51/60	72/60	72/8
Makrolid					
<i>erm42</i>	94/5	94/30	50/30	72/45	72/5
<i>msrE</i>	94/5	94/30	50/30	72/45	72/5
<i>mphE</i>	94/5	94/30	50/30	72/45	72/5
Aminoglikozid					
<i>StrA</i>	94/5	94/60	56/60	72/60	72/7
Sülfanamid					
<i>SulII</i>	94/5	94/60	56/60	72/60	72/7

3.2.8. İstatistiksel analiz

M. haemolytica izolatlarının biyokimyasal özelliklerine göre yakınlık derecelerinin dendogram analizi ile belirlenmesinde SPSS (2013) paket programı kullanıldı. İzolatların biyokimyasal özellikleriyle hastalık ve virülens ile ilişkili genleri arasındaki korelasyonun belirlenmesi amacıyla da Minitab (Demo versiyon 15-Erişim 15.11.2019) istatistik programı kullanılarak Z oran (Two-samples proportion test) ve Chi-square test yöntemleri kullanıldı (Gülaydın, 2018).

4. BULGULAR

4.1. *Mannheimia haemolytica*'nın İzolasyon ve İdentifikasyonu

4.1.1. İzolasyon

Çalışmada, sağlıklı/hasta sığır ve koyunların NF ve TB bölgelerinden alınan toplam 650 sıvap örneğinden kanlı agarda β hemolitik, Gram negatif kokobasil-küçük çomak 125 adet şüpheli bakteri izole edildi.

4.1.2. İdentifikasyon

Ön identifikasyon

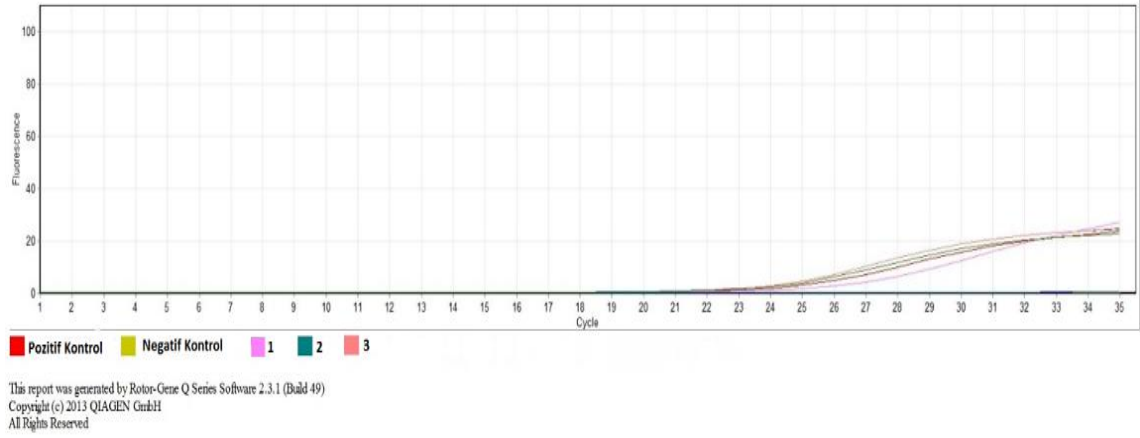
İzole edilen Gram negatif kokobasil-küçük çomak, kanlı agarda β hemolitik koloni oluşturan 125 adet izolatın 55'inin MacConkey agarda üremediği, TSI agarda glukozu fermente ettiği, oksidaz ve katalaz reaksiyonu pozitif, SIM medium besiyerinde hareketsiz, H₂S ve indol negatif olduğu tespit edildi ve *Mannheimia* spp. olarak değerlendirildi.

Real Time-PCR ile identifikasyon

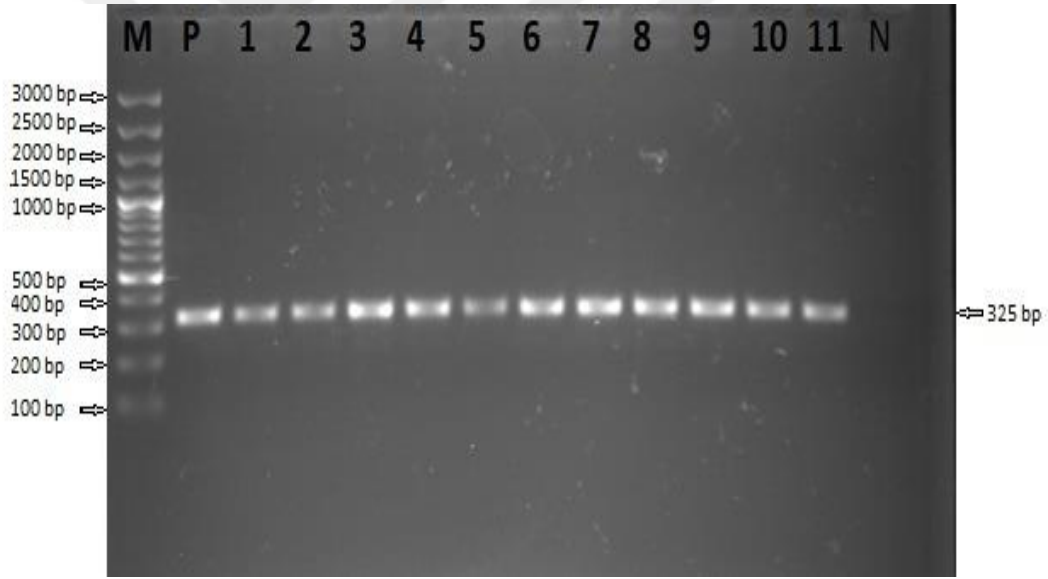
M. haemolytica gen spesifik primerlerin kullanıldığı Real Time-PCR yöntemi ile incelenen şüpheli 55 *Mannheimia* spp. izolatının 48'i *M. haemolytica* olarak identifiye edildi (Şekil 2, Şekil 3).

Cycling A.Green

Run Name : C:\Users\Admin\Desktop\Çihat-TEZ_28.01.2019
Print Date : 28.01.2019



Şekil 2. Real Time-PCR ile incelenen *M. haemolytica* izolatlarından elde edilen pozitif ampilifikasyon sonuçları.



Şekil 3. Real Time-PCR’da elde edilen ampikonların agaroz jel görüntüleri (325 bp) (M: 100 bp DNA marker; P: *M. haemolytica* Pozitif Kontrol; 1-11: *M. haemolytica* izolatları; N: Negatif Kontrol).

Araştırmada *M. haemolytica* olarak tanımlanmış 48 izolatın 44 (%91.6)’ü koyun, 4 (%8.4)’ü de sığırlardan elde edildi. İncelenen izolatların 19’u mezbahadaki sağlıklı koyunların NF boşluklarından, 21’i ise akciğerlerinde pnömoni lezyonu gözlenen 40 koyunun NF ve TB (11’i NF ve 10’u TB) bölgelerinden izole edildi. İzolatların 4’ü de sahada solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gözlenen hasta (9) koyunların NF boşluklarından elde edildi.

Mezbahadaki sağlıklı 133 sığırın NF ve TB bölgelerinden *M. haemolytica* izole edilemezken, hasta olan 5 sığırdan sadece 1'inin TB bölgesinden *M. haemolytica* izole edildi. Sahada solunum yolu enfeksiyonuna yönelik klinik belirtiler gözlenen 19 sığırın 3'ünün NF örneklerinden ise *M. haemolytica* izole edildi (Tablo 8).

Mezbahadaki hasta koyunların 3'ünden elde edilen 6 izolat, her bir koyunun hem NF hem de TB bölgelerinden ayrı ayrı izole edildi (Tablo 8). Ancak aynı koyunun farklı örneklerinden izole edilen suşların farklı fenotipik (biyokimyasal özellik) ve genotipik (virülens gen ve direnç gen profili) özelliklere sahip olduğu, dolayısıyla farklı izolatlar olduğu tespit edildi.

Tablo 8. *M. haemolytica* izolatlarının hayvan türü ve sağlık/hastalık durumlarına göre dağılımı.

Hayvan Türü	Materyal Kaynağı	Hayvan Sayısı	İzolat Sayısı		Toplam İzolat Sayısı	İzolasyon Oranı (%)
			NF	TB		
Sığır	Mezbaha/Sağlıklı	133	–	–		
Sığır	Mezbaha/Hasta	5	–	1	4	2.54
Sığır	Saha/Hasta	19	3	–		
Koyun	Mezbaha/Sağlıklı	133	19	–		
Koyun	Mezbaha/Hasta	40*	11	10	44	24.17
Koyun	Saha/Hasta	9	4	–		
Toplam		339	37	11	48	26.71

*: 3 hasta koyunun hem NF (Nazo-Farengiyal) ve hem de TB (Trake-Bronşial) bölgelerinden 6 adet farklı *M. haemolytica* izole edildi.

– : *M. haemolytica* izole edilmedi.

4.2. Biyokimyasal Özelliklerin Dağılımı

Real Time-PCR ile *M. haemolytica* olarak tanımlanan 48 izolatın, 45 biyokimyasal testi içeren test panelinin kullanıldığı BD Pheonix™ otomatize bakteri identifikasyon sistemi ile biyokimyasal özellikleri belirlendi (Şekil 4).

Lab Report

The Diagnostic Switch is ON

19/11/18 14:07
V6.21A / V6.21A (x-US)

Accession #	Test Start	18/11/18 21:19
Isolate #	Test End	19/11/18 09:28
Sequence #	Instr # / Station	1/A02
Panel Type	Finalized	No
Status		COMPLETE

Final ID	Inoculum Density	Mannheimia haemolytica	0.5
-----------------	-------------------------	------------------------	-----

Instrument ID(s)	Confidence Value
Mann. haemolytica	99%

<u>Biochemical</u>	<u>Instr Result</u>	<u>Expected Result</u>	<u>Biochemical</u>	<u>Instr Result</u>	<u>Expected Result</u>	<u>Biochemical</u>	<u>Instr Result</u>	<u>Expected Result</u>
A_ARARR	-	V	A_GLPRB	-	-	A_GLYB	-	-
A_GUGAH	-	-	A_LARGH	+	V	A_LGTA	-	-
A_LLEUH	+	+	A_LPHET	-	-	A_LPROB	-	-
A_LPYR	-	-	A_LTRY	-	-	A_LYALD	-	V
C_ACT	-	-	C_ADO	-	-	C_CIT	-	V
C_CLST	-	-	C_DMNT	+	+	C_KGA	+	+
C_MLO	-	V	C_PXB	-	-	C_TIG	-	V
M_NAG	-	-	N_LGGH	-	-	N_LPROT	-	-
P_BDGLU	-	V	P_BPHO	-	+	R BALL	-	-
R_BGEN	-	-	R_DEX	+	V	R_DFRU	+	V
R_DGAL	-	-	R_DGUA	-	-	R_DMLB	-	-
R_DSBT	-	-	R_DSUC	+	V	R_GRA	-	-
R_LARA	-	-	R_LRHA	-	-	R_MBGU	-	-
R_MTU	-	-	R_NGA	-	-	R_NGU	-	-
S_ORN	-	-	S_URE	-	-	T_ESC	-	V

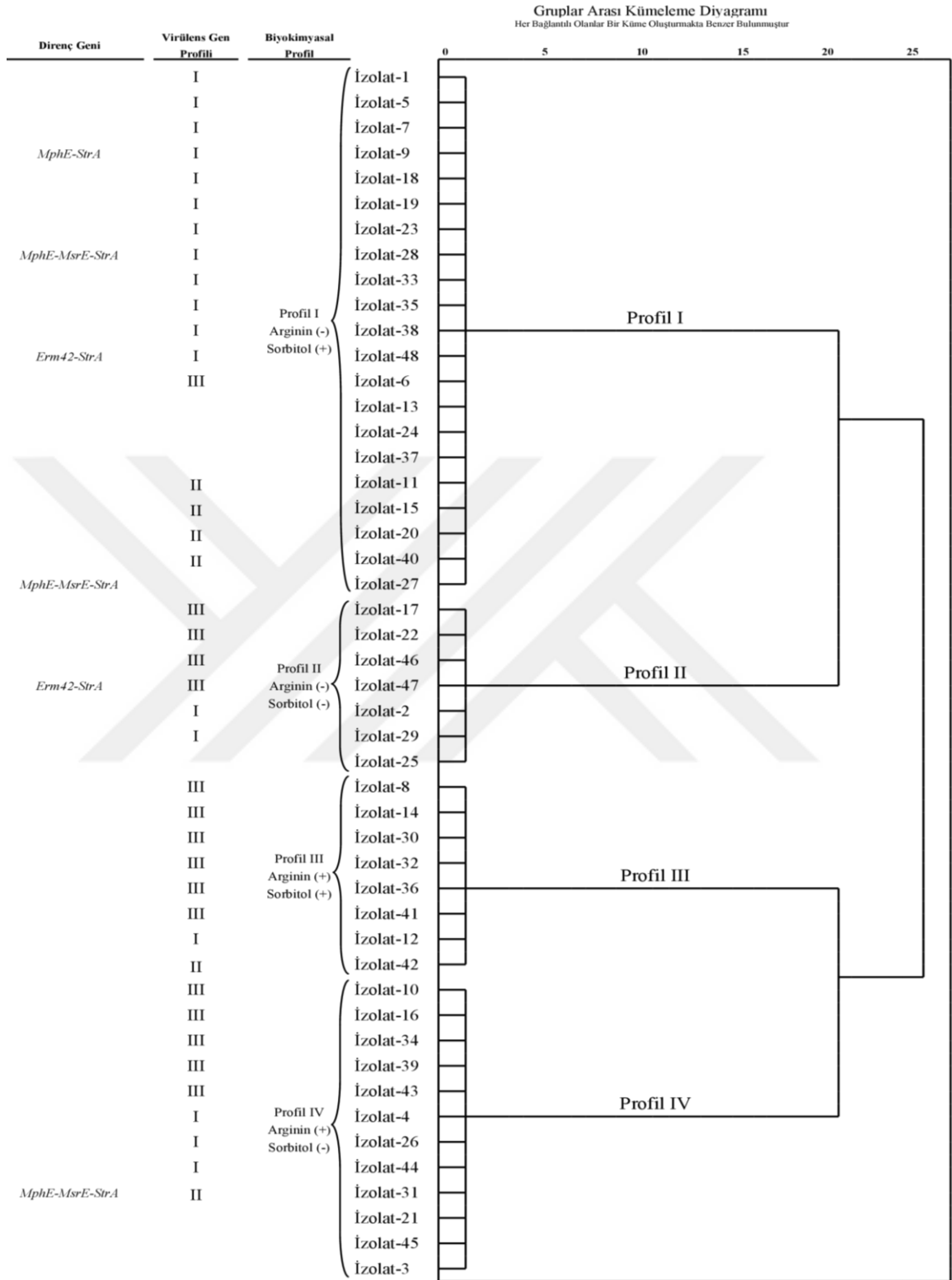
Şekil 4. BD Pheonix™ otomatize bakteri identifikasyon sisteminde *M.haemolytica* olarak identifiye edilen bir izolatın sonuç raporu.

BD Pheonix™ bakteri identifikasyon sisteminde biyokimyasal özellikleri belirlenen *M. haemolytica* izolatları arasında değişkenliğin oldukça fazla olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, 12 biyokimyasal özellikte (Arginin-arginin, L-lösin, PNP-BD glukoside, sorbitol, L-arginin, D-mannitol, BIS (PNP) fosfat, dekstroz, glisin, lizin-alanin, L-prolin ve eskülin fermentasyonu) belirlenen değişkenliklere göre izolatlarda çok sayıda değişkenlik gözlenmesine karşın, bu profiller arasında sadece arginin-arginin ve sorbitol testlerinde gözlenen farklılıklardan kaynaklanan 4 ana fenotipik profil belirlendi (Tablo 9).

İncelenen 48 izolatın 21 (%43.7)'inin arginin-arginin (-) /sorbitol (+), 7 (%14.6)'sinin arginin-arginin (-) /sorbitol (-), 8 (%16.7)'inin arginin-arginin (+) /sorbitol (+) ve 12 (%25)'sinin de arginin-arginin (+) /sorbitol (-) biyokimyasal profile sahip olduğu tespit edildi (Tablo 9, Şekil 5).

Tablo 9. *M. haemolytica* izolatlarında değişkenlik tespit edilen 4 ana biyokimyasal test sonucuna göre belirlenen biyokimyasal profiller.

Ana biyokimyasal profil				
	I	II	III	IV
Arginin-Arginin	-	-	+	+
Sorbitol	+	-	+	-
İzolat Sayısı (%)	21 (43.7)	7 (14.6)	8 (16.7)	12 (25)



Şekil 5. *M. haemolytica* izolatlarında arginin-arginin ve sorbitol test sonuçlarına göre belirlenen biyokimyasal profillerin dendrogram analizi, virülens ile ilişkili gen profilleri ve antimikrobiyal direnç genlerinin dağılımı.

4.3. Virülens İle İlişkili Genlerin Belirlenmesi

M. haemolytica izolatlarında Real Time-PCR yöntemiyle virülens ile ilişkili genleri incelenen izolatların, 46 (%95.8)'sında *gcp*, 42 (%87.5)'sinde *gs60*, 28 (%58.3)'inde *tbpB*, 45 (%93.8)'inde *lktC*, 8 (%16.7)'inde *nmaA* ve 44 (%91.7) 'ünde de *adh* geni belirlendi (Tablo 10).

Tablo 10. *M. haemolytica* izolatlarında tespit edilen virülens ile ilişkili genler.

	Virülens ile ilişkili genler [n (%)]					
	<i>gcp</i>	<i>gs60</i>	<i>tbpB</i>	<i>lktC</i>	<i>nmaA</i>	<i>adh</i>
Pozitif	46 (95.8)	42 (87.5)	28 (58.3)	45 (93.8)	8 (16.7)	44 (91.7)
Negatif	2 (4.2)	6 (12.5)	20 (41.7)	3 (6.2)	40 (83.3)	4 (8.3)

gcp: O-Sialoglikoproteaz; *gs60*: Dış membran lipoprotein; *tbpB*: Transferrin bağlayan protein; *lkt*: Lökotoksin; *nmaA*: UDP-N-Acetyl-D-Glukozamin-2-Epimeraz; *adh*: Adhezyon

4.3.1. Virülens ile ilişkili gen profilleri

Virülens ile ilişkili genlerin incelenen izolatlardaki dağılımına göre farklı gen profilleri oluşmasına karşın, üç ve daha az sayıda virülens ile ilişkili gen tespit edilen izolatlar profil olarak değerlendirilmedi. Buna göre, izolatların büyük çoğunda (%83.3) virülens ile ilişkili gen profili I (%37.5), III (%33.3) ve II (%12.5) olmak üzere 3 farklı gen profili gözlemlendi. Bununla birlikte, profil II'ye sahip izolatlarda tüm virülens ile ilişkili genler bulunurken, profil I'e sahip izolatlarda *nmaA*, profil III'e sahip izolatlarda ise hem *nmaA* hem de *tbpB* genleri tespit edilemedi (Tablo 11).

Tablo 11. *M. haemolytica* izolatlarında tespit edilen virülens ile ilişkili gen profilleri.

Profil	n(%)	Virülens ile ilişkili genler					
		<i>gcp</i>	<i>gs60</i>	<i>tbpB</i>	<i>lktC</i>	<i>nmaA</i>	<i>adh</i>
I	18 (37.5)	+	+	+	+	-	+
II	6 (12.5)	+	+	+	+	+	+
III	16 (33.3)	+	+	-	+	-	+

4.3.2 *M. haemolytica* izolatlarında belirlenen ana biyokimyasal profillerde virülens ile ilişkili gen profillerinin dağılımı

İncelenen *M. haemolytica* izolatlarının 21 (%37.5)'inde belirlenen biyokimyasal profil I, virülens ile ilişkili gen profili I ve II'ye sahip 18 ve 6 izolatın sırasıyla 12 (%66.66) ve 4 (%66.66)'ünde belirlendi. İzolatların 7 (%14.6)'sinde belirlenen biyokimyasal profil II ise, virülens ile ilişkili gen profil III'e sahip 16 izolatın 4 (%25)'ünde tespit edilirken, virülens gen profili I'e sahip 18 izolatın sadece 2 (%11.11)'sinde gözlemlendi.

İzolatların 8 (%16.7)'inde belirlenen biyokimyasal profil III, virülens ile ilişkili gen profil III'e sahip 16 izolatın 6 (%37.5)'sında tespit edilirken, virülens gen profili I ve II'ye sahip birer izolat (%5.55 ve %16.66) belirlendi. İzolatların 12 (%25)'sinde tespit edilen biyokimyasal profil II ise, virülens ile ilişkili gen profil III'e sahip 16 izolatın 5 (%31.25)'inde belirlenirken, virülens gen profili I'e sahip izolatların 3 (%16.66)'ünde gözlemlendi (Tablo 12).

Tablo 12. *M. haemolytica* izolatlarında tespit edilen virülens ile ilişkili gen profillerinin ana biyokimyasal profillerdeki dağılımı.

Virülens ile ilişkili gen profili							Biyokimyasal profil (%)				
Profil	<i>gcp</i>	<i>gs60</i>	<i>tbpB</i>	<i>lktC</i>	<i>nmaA</i>	<i>adh</i>	n	I	II	III	IV
								Arg – Sor +	Arg – Sor –	Arg + Sor +	Arg + Sor –
I	+	+	+	+	–	+	18	12(66.66)	2(11.11)	1(5.55)	3(16.66)
II	+	+	+	+	+	+	6	4(66.66)		1(16.66)	1
III	+	+	–	+	–	+	16	1(6.25)	4(25)	6(37.5)	5(31.25)
Toplam							40	17	6	8	9

Arg: Arginin-Arginin, Sor: Sorbitol

4.4. Biyokimyasal Profillerin, Virülens ile ilişkili Gen Profili ve Hayvanların Sağlık Durumu ile İlişkisi

Elde edilen verilerin istatistiksel analizine göre yapılan değerlendirmede; biyokimyasal profil I'e sahip izolatların sadece virülens gen profili I ile ilişkili ($p<0.01$) olduğu, biyokimyasal profil II'nin ise hastalık olgularından elde edilen izolatlar ile ilişkili ($p<0.01$) olduğu (Tablo 12) ve bunun sadece arginin-arginin negatiflikten kaynaklandığı ($p<0.05$) tespit edildi (Tablo 13).

Bununla birlikte virülens gen III profiline sahip izolatların ise biyokimyasal profil I ile ilişkili olmadığı ($p>0.05$), ancak arginin pozitif izolatlar ile virülens gen profil III arasında ilişkinin önemli olduğu ($p<0.01$) belirlendi (Tablo 13).

Buna karşın, sorbitol pozitif veya negatif izolatların hastalık olguları ile ilişkili olmadığı ($p>0.05$) belirlendi. Ayrıca, sorbitol pozitif veya negatif izolatlar ile virülens gen profilleri arasında herhangi bir ilişki bulunmazken (Tablo 13), virülens gen profil II'nin de biyokimyasal profiller ve hastalık olguları ile ilişkili olmadığı ($p>0.05$) tespit edildi.

Tablo 13. Arginin-arginin ve sorbitol pozitif/negatif *M. haemolytica* izolatlarının hastalık ve virülens gen profilleri ile ilişkisi.

	Arginin(+) n=20	Arginin (-) n=28	Sorbitol (+) n=29	Sorbitol (-) n=19
Sağlık Durumu				
Hasta (%)	9 (45)	20 (71) ^a	17 (59)	12 (63)
Sağlıklı (%)	11(55)	8 (29)	12 (41)	7 (37)
Virülens Gen Profil II				
Pozitif (%)	4 (25)	14 (50) ^b	13 (45)	5 (26)
Negatif (%)	16 (75)	14 (50)	16 (55)	14 (74)
Virülens Gen Profil V				
Pozitif (%)	11 (55) ^c	5 (18)	7 (24)	9 (47)
Negatif (%)	9 (45)	23 (82)	22 (76)	10 (53)

a; Arginin negatif izolatlar ile hastalık olguları arasında ilişki ($p<0.05$).

b; Arginin negatif izolatlar ile virülens gen profil I arasındaki ilişki ($p<0.05$).

c; Arginin pozitif izolatlar ile virülens gen profil III arasındaki ilişki ($p<0.01$).

Tablo 14. *M. haemolytica* izolatlarında belirlenen virülens ile ilişkili gen profillerinin hayvanların sağlık/hastalık durumlarına göre dağılımı.

	I	II	III	Negatif
Hasta	12	4	7	6
Sağlıklı	6	2	9	2

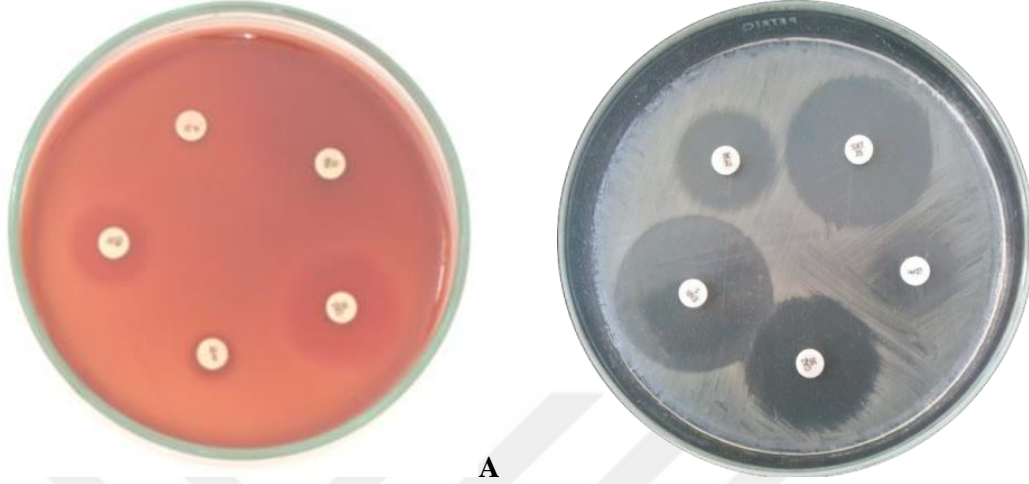
Negatif: Virülens gen profili olarak değerlendirilmeyen az sayıda izolatın hayvanların sağlık/hastalık durumlarına göre dağılımını göstermektedir.

4.5. Antimikrobiyal Duyarlılık

4.5.1. Disk difüzyon testi

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile incelenen izolatların 5 (%10.4)'ünün eritromisin, 5 (%10.4)'ünün tilmikosin, 3 (%2.1)'ünün streptomisin, 4 (%8.3)'ünün

tetrasiklin, 2 (%4.2)'sinin penisilin ve 2 (%4.2)'sinin de ampisiline dirençli olduğu tespit edilirken, tüm izolatlar gentamisin ceftazidim, enrofloksasin ve sülfamethaksazol+trimetoprime karşı duyarlı bulundu (Şekil 6, Tablo 15).



Şekil 6. *M. haemolytica* izolatlarında inhibisyon zon çapları. (A: Kanlı agar, B: Müller Hinton agar)

Tablo 15. *M. haemolytica* izolatlarının disk difüzyon testinde kullanılan antimikrobiyal maddelere karşı *in vitro* duyarlılıkları [n (%)].

Antimikrobiyal Madde	Değerlendirme Kriteri (mm)	S	I	R
E	≤13→≥23 ^a	22 (45.9)	21 (43.7)	5 (10.4)
TİL	≤10→≥14 ^b	43 (89.6)	0	5 (10.4)
STR	≤12→≥15 ^c	38 (79.2)	7 (14.5)	3 (6.3)
CN	≤12→≥15 ^a	46 (95.8)	2 (4.2)	0
TET	<24→≥24 ^d	44 (91.7)	0	4 (8.3)
P	<17→≥17 ^d	46 (95.8)	0	2 (4.2)
A	<17→≥17 ^e	46 (95.8)	0	2 (4.2)
CAZ	≤17→≥21 ^f	47 (97.9)	1 (2.1)	0
ENR	≤16→≥21 ^b	48(100)	0	0
SXT	<23→≥23 ^d	48 (100)	0	0

a: CLSI 2002 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

b: CLSI 2018 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

c: CLSI 2002 (Gentamisine ait değerlendirme kriteri kullanıldı).

d: EUCAST 2019 (*P. multocida*'ya ait değerlendirme kriteri kullanıldı).

e: EUCAST 2019 (*P. multocida* için Penisilin-G değerlendirme kriteri kullanıldı).

f: CLSI 2018 (Ceftiofur'a ait değerlendirme kriteri kullanıldı)

E: Eritromisin, TİL: Tilmikosin, STR: Streptomisin, CN: Gentamisin, TET: Tetrasiklin, P: Penisilin, A: Ampisilin, CAZ: Ceftazidim, ENR: Enrofloksasin, SXT: Sülfamethaksazol+Trimetoprim.

S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli.

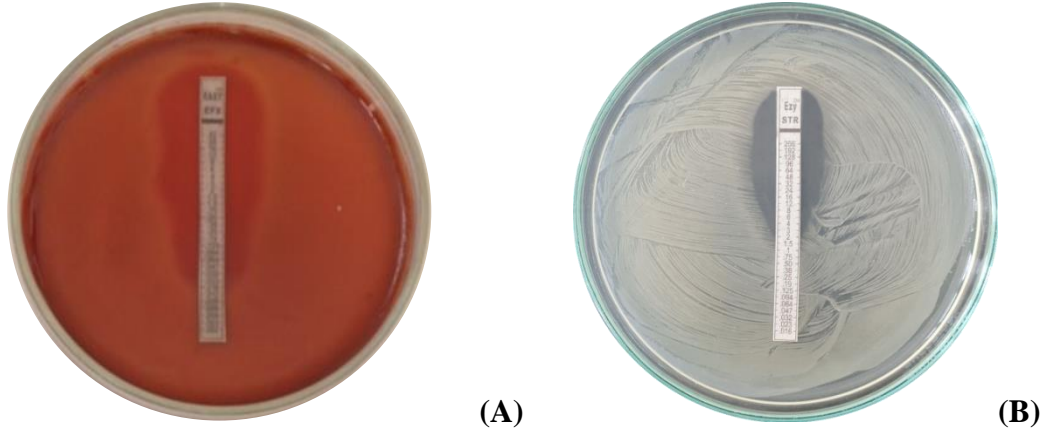
n; İzolat sayısı

4.5.2. MİK değerlerinin belirlenmesi

E-test yöntemi ile daha önce bildirilen kriterlere göre incelenen izolatlarda MİK aralığı; eritromisin 0.19-32 µg/ml, tilmikosin 0.012-32 µg/ml, streptomisin 0.75-64 µg/ml, gentamisin 0.125-0.75 µg/ml, tetrasiklin 0.064-32 µg/ml, penisilin 0.047-24 µg/ml, ampisilin 0.016-32 µg/ml, ceftazidim 0.016-0.19 µg/ml, enrofloksasin 0.002-0.032 µg/ml ve sülfamethaksazol+trimetoprim 0.002-0.064 µg/ml olarak belirlendi. İzolatların 5 (%10.4)'ünün eritromisin, 6 (%12.5)'sının tilmikosin, 5 (%10.4)'ünün streptomisin, 4 (%8.3)'ünün tetrasiklin 7 (%14.6)'sinin penisiline ve 3 (%6.3)'ünün de ampisiline dirençli olduğu tespit edildi.

İncelenen izolatların tamamı gentamisin, ceftazidim, enrofloksasin ve sülfamethaksazol+trimetoprime duyarlı bulundu (Şekil 7; Tablo 16).

E-test ile incelenen izolatlarda MİK₅₀-MİK₉₀ değerleri de, eritromisin 0.75-3.0 µg/ml, tilmikosin 1.5-8.0 µg/ml, streptomisin 3.0-12.0 µg/ml, gentamisin 0.38-0.5 µg/ml, tetrasiklin 0.25-0.38 µg/ml, penisilin 0.19-0.25 µg/ml, ampisilin 0.125-0.38 µg/ml, ceftazidim 0.047-0.094 µg/ml, enrofloksasin 0.004-0.016 µg/ml ve sülfamethaksazol+trimetoprime 0.008-0.016 µg/ml olarak belirlendi (Tablo16, Tablo 17).



Şekil 7. MİK değerlerinin E-test yöntemi ile tespiti. (A: Kanlı agar; B: Müller Hinton agar)

Tablo 16. *M. haemolytica* izolatlarında antimikrobiyal maddeler için E-test ile belirlenen MİK değerleri.

Antimikrobiyal Madde	Değerlendirme Kriteri (µg/ml)	E-test ile Elde Edilen MİK Değerleri (µg/ml) ^a																								Dirençli izolat Sayısı n(%)					
		0.002	0.003	0.004	0.006	0.008	0.012	0.016	0.023	0.032	0.047	0.064	0.094	0.125	0.19	0.25	0.38	0.5	0.75	1.0	1.5	2	3	4	6		8	12	16	24	32
E	≤0.5→8 ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2*	15	16	5	3	<u>1</u>	0	0	0*	0	2	1	2	0	5 (10.4)
TİL	≤8 →32 ^c	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	7	6	9	1	5	7	<u>2</u> *	0	0	0	6*	0	6 (12.5)
STR	≤32→64 ^d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	5	8	10	9	4	<u>2</u>	0	0	0*	5*	5 (10.4)
CN	≤4→16 ^d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	10	<u>24</u>	8	0	0	0	0	0*	0	0	0	0*	0	0	0	0
T	≤2→8 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	9	11	<u>15</u>	6	0	0	0	0*	0	0	0	1*	1	0	0	2	0	4 (8.3)
P	≤0.25→1 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	8	9	3*	6	4	<u>5</u>	3*	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	7 (14.6)
A	≤1→1 ^e	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	8	10	6	6	<u>6</u>	5	0	0*	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3 (6.3)
CAZ	≤2→8 ^f	0	0	0	0	0	7	1	4	5	12	<u>11</u>	6	2	0	0	0	0	0	0	0*	0	0	0	0*	0	0	0	0	0	0
ENR	≤0.25→2 ^c	7	5	10	5	5	6	<u>5</u>	2	3	0	0	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SXT	≤0.25→0.25 ^e	1	3	3	6	4	15	<u>9</u>	3	2	1	1	0	0	0	0*	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a: Bold rakamlar **MİK50**, altı çizili rakamlar MİK90 değerini göstermektedir.

b: CLSI 2002 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

c: CLSI 2018 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

d: NARMS 2009 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

e: EUCAST 2019 (*P. multocida*'ya ait değerlendirme kriteri kullanıldı).

f: CLSI 2018 (Ceftiofur değerlendirme kriteri kullanıldı).

*: Antimikrobiyal madde değerlendirme kriteri MİK aralığını belirtmektedir.

Tablo 17. E-test ve disk difüzyon testi ile dirençli bulunan izolatlar ve antimikrobiyal duyarlılıkları belirlenen tüm izolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

Antimikrobiyal Madde	Değerlendirme Kriteri (µg/ml)	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)	Dirençli İzolat Sayısı (%)	
					E-test	Disk Difüzyon
E	≤0.5-≥8 ^a	0.19-32	0.75	3.0	5 (10.4)	5 (10.4)
TİL	≤8 -≥32 ^b	0.012-32	1.5	8.0	6 (12.5)	5 (10.4)
STR	≤32-≥64 ^c	0.75-64	3.0	12.0	5 (10.4)	3 (6.3)
CN	≤4-≥16 ^c	0.125-0.75	0.38	0.5	0	0
T	≤2-≥8 ^a	0.064-32	0.25	0.38	4 (8.3)	4 (8.3)
P	≤0.25-≥1 ^a	0.047-24	0.19	0.75	7 (14.6)	2 (4.2)
A	≤1-≥1 ^d	0.016-32	0.125	0.38	3 (6.3)	2 (4.2)
CAZ	≤2-≥8 ^e	0.016-0.19	0.047	0.094	0	0
ENR	≤0.25-≥2 ^a	0.002-0.032	0.004	0.016	0	0
SXT	≤0.25-≥0.25 ^d	0.002-0.064	0.008	0.016	0	0

a: CLSI 2002 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

b: CLSI 2018 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

c: NARMS 2009 tarafından bildirilen değerlendirme kriterleri kullanıldı.

d: EUCAST 2019 (*P. multocida*'a ait değerlendirme kriterleri kullanıldı).

e: CLSI 2018 (Ceftiofur'a ait değerlendirme kriteri kullanıldı).

MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon.

Disk difüzyon testi ile incelenen izolatların 6 (%12.5)'sı, E-test ile incelenen izolatların ise 9 (%18.75)'unda, incelenen antimikrobiyal maddelere karşı antimikrobiyal direnç belirlendi. Tilmikosin, streptomisin, penisilin ve ampisilline dirençliliğe yönelik E-test ve disk difüzyon testi ile elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar gözlemlendi. İncelenen 2 izolat E-test ve disk difüzyon testinde penisilin ve ampisilline dirençli bulunurken, E-test ile penisiline dirençli bulunan 7 izolatın 5'i ve ampisiline dirençli bulunan 3 izolatın da 1'i disk difüzyon testinde duyarlı bulundu. (Tablo 17, Tablo 18).

E-test ile dirençli bulunan 9 izolatla 6 farklı antimikrobiyal direnç profili tespit edildi. Her iki testte sadece eritromisine dirençli bulunan 1 izolatla MİK değerinin 16 µg/ml olduğu belirlendi. E-testte, sadece penisiline dirençli bulunan 2 izolatla MİK

değerlerinin sırasıyla 1 ve 1.5 µg/ml, tilmikosin ve penisiline dirençli bulunan iki izolatta ise 64< ve 1 µg/ml olarak bulunurken, bu izolatların disk difüzyon testinde duyarlı olduğu gözlemlendi.

E-test ile dirençli bulunan diğer 1 izolatta MİK değerleri tilmikosin için 32 µg/ml, streptomisin için 64 µg/ml ve penisilin için 1 µg/ml olarak belirlenirken, bu izolat disk difüzyon testinde sadece tilmikosine dirençli bulundu.

E-testte, dirençli bulunan diğer 1 izolatta MİK değerleri eritromisin için 24 µg/ml, tilmikosin için 32 µg/ml, streptomisin için 64 µg/ml ve tetrasiklin için 12 µg/ml olarak tespit edilirken, disk difüzyon testinde sadece streptomisine duyarlı bulundu.

Her iki testte çoklu direnç belirlenen 3 izolattan 2'sinde MİK değerleri eritromisin için 32 µg/ml, tilmikosin için 32 µg/ml, streptomisin için 64 µg/ml, tetrasiklin için 32 µg/ml, penisilin için 24 µg/ml ve ampisilin için 32 µg/ml olarak bulunurken, disk difüzyon testinde penisiline ve ampisiline duyarlı bulunan diğer 1 izolatta MİK değerleri eritromisin için 32 µg/ml, tilmikosin için 32 µg/ml, streptomisin için 64 µg/ml, tetrasiklin için 8 µg/ml, penisilin için 4 µg/ml, ampisilin için 1.5 µg/ml olarak belirlendi. (Tablo 18).

Tablo 18. E-test ve disk difüzyon testlerinde dirençli bulunan *M. haemolytica* izolatlarında belirlenen fenotipik direnç profilleri.

Antimikrobiyal Direnç Profili	E-test		Disk Difüzyon	
	n	MİK (µg/ml)	Antimikrobiyal Direnç Profili	n
E	1	16	E	1
P	2 ^a	1, 1.5	-	0
TİL, P	1 ^b	64<, 1	-	0
TİL, STR, P	1 ^c	32, 64, 1	TİL	1
E, TİL, STR, T	1	24, 32, 64, 12	E, TİL, T	1
E, TİL, STR, T, P,	2	32, 32, 64, 32, 24, 32	E, TİL, STR, T, P, A	2
A	1 ^d	32, 32, 64, 8, 4, 1.5	E, TİL, STR, T	1
Toplam	9			6

a: E-testte dirençli, disk difüzyon testinde duyarlı bulunan izolatlar.

b: Disk difüzyon testinde Penisilin'e ve Tilmikosin'e duyarlı izolatlar.

c: Disk difüzyon testinde Penisilin'e ve Streptomisin'e duyarlı izolat.

d: Disk difüzyon testinde Penisilin'e ve Ampisilin'e duyarlı izolat.

n: İzolat sayısı

4.6. Antimikrobiyal Direnç Genleri

E-test ile antimikrobiyal maddelere dirençli bulunan 9 izolatın 6'sında makrolid direnç genleri tespit edilirken, tetrasiklin, beta-laktam ve sülfanamid grubu antimikrobiyal maddelere karşı direnç genleri tespit edilemedi. Makrolid direnci belirlenen 6 izolatın 1'inde *mphE*, 3'ünde *mphE* ve *msrE*, 2'sinde de *erm42* geni bulundu. Makrolid direnç geni bulunan 6 izolatın 5'inde de aynı zamanda aminoglikozid direnç geni *strA* belirlendi. (Tablo 19, Tablo 20).

Tablo 19. E-test ile dirençli bulunan 9 izolatta tespit edilen direnç genlerinin antimikrobiyal madde gruplarındaki dağılımı.

Antimikrobiyal Madde grubu	n	Direnç Geni	n (%)
Makrolid	6	<i>mphE</i>	1 (16.7)
		<i>mphE-msrE</i>	3 (50)
		<i>erm42</i>	2 (33.3)
Aminoglikozid	5	<i>strA</i>	5 (100)
Tetrasiklin	0	<i>tetH</i>	0
Beta-laktam	0	<i>bla_{ROB-1}</i>	0
Sülfanamid	0	<i>sulII</i>	0

E-test ile dirençli bulunan 9 izolatta belirlenen fenotipik direnç profilleri ile direnç geni tespit edilen 6'izolattaki direnç gen profilleri karşılaştırıldığında; her iki testte sadece eritromisine dirençli bulunan 1 izolatta makrolid direnç geni *mphE* tespit edildi. Sadece E-test ile penisiline dirençli bulunan 2 izolat ile penisilin ve tilmikosine dirençli bulunan 1 izolatta direnç genleri belirlenemedi.

Tilmikosin, streptomisin ve penisilin direnci belirlenen 1 izolatta makrolid direnç geni *erm42* ve aminoglikozid direnç geni *strA* tespit edilirken, benzer gen profili eritromisin, tilmikosin streptomisin ve tetrasikline dirençli bulunan 1 izolatta da belirlendi.

Buna karşın, E-test ile eritromisin, tilmikosin, streptomisin, tetrasiklin, penisilin ve ampisiline karşı çoklu direnç belirlenen 3 izolatta, makrolid direnç genlerinden *mphE*, *msrE* ve aminoglikozid direnç geni *strA* bulunmakla birlikte, makrolid grubu

erm42 geni tespit edilemedi. Bu izolatlardan 2'sinde tetrasiklin, penisillin ve ampisilin için belirlenen MİK değerlerinin (32, 24, 32 µg/ml) de, disk difüzyon testinde penisilin ve ampisiline duyarlı bulunan diğer 1 izolatta belirlenen MİK değerlerinden (8, 4, 1.5 µg/ml) daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 20).

Tablo 20. E test ile dirençli bulunan *M. haemolytica* izolatlarında belirlenen fenotipik direnç profillerinde direnç gen profillerinin dağılımı.

Antimikrobiyal direnç profili	n:9	MİK (µg/ml)	Direnç gen profili
E	1	16	<i>mphE</i>
P	2	1, 1.5	-
TİL, P	1	64<, 1	-
TİL, STR, P	1	32, 64, 1	<i>erm42, strA</i>
E, TİL, STR, T	1	24, 32, 64, 12	<i>erm42, strA</i>
E, TİL, STR, T, P, A	2	32, 32, 64, 32, 24, 32	<i>mphE, msrE, strA</i>
E, TİL, STR, T, P, A	1	32, 32, 64, 8, 4, 1.5	<i>mphE, msrE, strA</i>

***Bold** karakterde yazılan harfler disk difüzyon testinde duyarlı izolatları tanımlamaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır ve koyunların solunum sistemi hastalığı gerek ülkemizde gerekse dünyada önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıklardan biridir. Hastalığın ortaya çıkışında bakteri, virüs ve parazit gibi etiyolojik ajanların yanı sıra, yetersiz beslenme, iklim değişikliği, yetersiz barınak şartları, transport gibi çeşitli çevresel faktörler etkili olmaktadır (Jesse ve ark., 2019). Sığır ve koyunların solunum yollarında fırsatçı patojen olarak bulunan *M. haemolytica*, konakçı immun sisteminin zayıfladığı durumlarda primer ve/veya sekonder bakteriyel etken olarak hastalık tablosu meydana getirebilmektedir. *M. haemolytica* sığır ve koyunlarda enzootik pnömoni, sepsisemi, pnömonik pastörelloz (shipping fever) ve mastitise neden olmaktadır (Gürbüz, 2003; Muhomed ve Abdelsalam, 2008; Ermilio ve ark., 2011; Castillo ve ark., 2017; Jesse ve ark., 2019).

Sığır ve koyunların solunum yollarından *M. haemolytica* suşlarının izolasyonu, konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle identifikasyonu, biyotiplendirilmesi, serotiplendirilmesi, genotiplendirilmesi ve virülens ile ilişkili genlerin tespiti, *in-vitro* antimikrobiyal duyarlılıkları ve antimikrobiyal direnç genlerinin tespitine yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Bisgaard, 1977; Kehrenberg ve ark., 2001; Angen ve ark., 2002; Lee ve ark., 2003; Catry, 2005; Hawari ve ark., 2008; Katsuda v ark., 2009; Michael ve ark., 2012; Hounsone, 2012; Klima ve ark., 2014; Clawson ve ark., 2016; Ahmet ve ark., 2017; Daphal ve ark., 2018). Bununla birlikte, ülkemizde sığır ve koyunlardan alınan çeşitli örneklerden elde edilen *M. haemolytica* izolatlarında konu ile ilgili yapılmış sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. (Kırkan, 2003; Gürbüz, 2003; Özbey ve Muz, 2004; İlhan ve Keleş, 2007; Yavrucu, 2008; Solmaz ve İlhan, 2011).

Bu çalışmada, sağlıklı ve hasta sığır ve koyunların solunum yolundan elde edilen *M. haemolytica* izolatlarının biyokimyasal özellikleri, virülens ile ilişkili genler, antimikrobiyal direnç ve direnç ile ilişkili genlerin varlığı araştırıldı. Ayrıca izolatların fenotipik ve genotipik özellikleri ile hayvanların hastalık durumu arasında olası ilişkiler değerlendirildi.

M. haemolytica'nın prevalansının belirlenmesine yönelik dünyada ve ülkemizde birçok çalışma yapılmıştır. Ülkemizde *M. haemolytica*'nın prevalansının belirlenmesi

ile ilgili yapılan çalışmalarda, mezbahada kesimi yapılan hayvanlardan alınan örneklerde bakteriyolojik yöntemler kullanılmıştır (Yener ve ark., 2001; Gürbüz, 2003; Kırkan ve Kaya, 2005; Tel ve Keskin 2010; Ülker ve ark., 2012; Dağ ve ark., 2018). Bitlis ilinde 1505 keçiden alınan akciğer örneklerinin makroskopik-patolojik olarak incelenmesi sonucunda, pnömoni bulguları tespit edilen 74 (%4.91) akciğer örneğinin 16 (%38.09)'sından *M. haemolytica* izole edildiği bildirilmiştir (Yener ve ark., 2001). Kars ve yöresinde yapılan benzer bir çalışmada ise, incelenen toplam 231 sığır ve koyundan alınan akciğer örneklerinin 61 (%26.4)'inden *M. haemolytica* izole edildiği rapor edilmiştir. (Gürbüz, 2003). Diğer bazı bölgelerde (Aydın ve Urfa) yapılan çalışmalarda da (Kırkan ve Kaya, 2005; Tel ve Keskin 2010) sırasıyla, pnömoni lezyonları gözlenen 200 koyun akciğerinin 22 (%11)'sinden ve 240 koyun akciğer örneğinin de 30 (%12.5)'undan *M. haemolytica* izole edildiği bildirmiştir. Antakya'da yapılan bir çalışmada da 122 sığır akciğer örneğinden *M. haemolytica* izole edilmediği rapor edilmiştir (Ülker ve ark., 2012). Diğer bir araştırmada ise, pnömoni lezyonları gözlenen 100 adet koyun akciğer örneğinin 19 (%19)'undan *M. haemolytica* izole edildiği bildirilmiştir (Dağ ve ark., 2018).

Aydın ve çevresindeki mezbahalarda kesimi yapılan 309 sığırın trakeal boşluğundan alınan sıvap örneklerinin 30 (%9.7)'undan *P. multocida* ve 4 (%1.3)'ünden *M. haemolytica* izole edildiği bildirilmiştir (Baysan, 2007). Önat ve ark. (2010) ise, 47 sığırdan alınan bilateral burun sıvap örneklerinin 5 (%10.6)'inden *M. haemolytica* izole edildiğini bildirmişlerdir.

Deressa ve ark. (2005) klinik olarak pnömoni bulguları gözlenen koyunların solunum yolundan alınan ve bakteriyolojik ve PCR yöntemleri ile incelenen 74 örneğin 14 (%18.9)'ünden *M. haemolytica* izole edildiği bildirmiştir.

Demissie ve ark. (2014) makroskopik pnömoni lezyonları gözlenen 167 koyun akciğer örneğinin 57 (%34.1)'sinden *M. haemolytica* izole edildiğini rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise benzer lezyonların gözlendiği 96 koyunun akciğer doku örneklerinin 52 (%54.1)'sinden *M. haemolytica* izole edildiği bildirilmiştir (Singh ve ark., 2018). Hasta ve sağlıklı sığır, bufalo, koyun ve keçilerin nazal akıntı ve akciğer dokularından alınan 315 örneğin konvansiyonel bakteriyolojik ve PCR yöntemleri kullanılarak incelendiği diğer bir araştırmada (El Dokmak, 2015), sığırların %5.3'ünde,

koyunların ise %3.3'ünde *M. haemolytica* tespit edildiği bildirilmiştir. Abera ve ark. (2014), hasta ve sağlıklı sığırlardan alınan toplam 329 nazal sıvap ve pnömonik akciğer örneğinin 13 (% 4)'ünden *M. haemolytica* izole edildiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada da, Noyes ve ark. (2015) solunum yolu enfeksiyonu belirtileri gözlenen 5498 sığırdan alınan nazo-farengiyal sıvap örneğinin 1596 (%29)'sından, Castillo ve ark. (2017) solunum yolu enfeksiyonu gözlenen 88 sığırdan alınan nazal sıvap örneğinin 70 (%79.5)'inden *M. haemolytica* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Legesse ve ark. (2018) da klinik pnömoni tespit edilen 76 koyundan alınan nazal sıvap örneğinin 26 (%34)'sından *M. haemolytica* izole edildiğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada, solunum yolu enfeksiyonu saptanan 24 sığırın 4 (%2.54)'ünden ve 49 koyunun 25 (%51)'inden ve sağlıklı olduğu belirlenen 133 koyunun ise 19 (% 14.3)'undan *M. haemolytica* izole edildi. Çalışmada sığırlarda belirlenen *M. haemolytica* izolasyon oranının Ülker ve ark. (2012)'nin bildirdiği orandan yüksek; Gürbüz (2003), Önat ve ark. (2010), Noyes ve ark. (2015) ve Castillo ve ark. (2017) tarafından bildirilen oranlardan daha düşük olduğu belirlendi. Bununla birlikte koyunlardan elde edilen izolat oranının, Gürbüz (2003) ve Demissie ve ark. (2014)'nin bildirdiği oranlardan düşük, Kırkan ve Kaya (2005), Tel ve Keskin (2010)'nin bildirdiği oranlardan ise yüksek olduğu tespit edildi. Araştırmalarda gözlenen farklılıkların yetiştirme yöntemleri, iklim ve ahır şartlarının yöreden yöreye değişkenlik göstermesinden kaynaklandığı düşünüldü.

M. haemolytica izolatlarında biyokimyasal özellikler çok fazla değişkenlik göstermektedir. Bisgaard (1977), sığırların trakeal boşluğundan izole edilen *M. haemolytica* suşlarında indol, MR, VP, arabinoz ve eskülin test sonuçlarının negatif bulunduğunu, laktoz fermentasyonunun ise değişkenlik gösterdiğini bildirmiştir. Daphal ve ark. (2018) da küçük ruminantlardan elde edilen 7 *M. haemolytica* izolatının indol, MR-VP ve sitrat test sonuçlarının negatif olduğu bildirilmiştir. Angen ve ark. (1997) ise, sığır ve koyunlardan izole edilen 246 trehaloz negatif *M. haemolytica* izolatının, MacConkey agarda üreme, indol ve sorbitol test sonuçlarının değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. İzolatlar arasında 10 farklı biyogrubun belirlendiği araştırmada, 5 biyogrupta MacConkey agarda üreme özelliğinin değişken olduğu, diğer 5 biyogruptaki izolatların ise MacConkey agarda üremedikleri bildirilmiştir. Bağdat'ta yapılan bir

çalışmada (Ahmed ve ark., 2017), ticari identifikasyon kiti kullanılarak, 3'ü akciğer dokusundan, 2'si de nazal boşluktan identifiye edilen toplam 5 *M. haemolytica* izolatının tamamının ramnoz, indol, nitrat pozitif; jelatinaz, üre, inositol, ksiloz, mannitol, arabinoz, maltoz negatif bulunduğu bildirilmiştir.

Taunde ve ark. (2019), şiddetli solunum sistemi enfeksiyon belirtileri gözlenen keçilerden izole edilen 40 *M. haemolytica* izolatının 16 (%15)'sının kanlı agarda β hemolitik, 34 (%85)'ünün ise non-hemolitik koloniler oluşturduğunu, izolatların tamamının MacConkey agarda üremediğini, eskülin pozitif ve ONPG negatif bulunduğunu (atipik suş) ve olumsuz çevre şartlarında *M. haemolytica* saha izolatlarının atipik özelliklere sahip olabileceğini rapor etmişlerdir.

Gürbüz (2003) sığır ve koyunlardan elde edilen 61 *M. haemolytica* izolatının tamamının indol negatif; arabinoz, ksiloz, salisin ve trehaloz reaksiyonlarının ise değişken olduğunu bildirmiştir. Van bölgesinde mezbahada kesimi yapılan koyunların akciğer örneklerinden izole edilen 66 (%11.3) *M. haemolytica* izolatının biyotip ve serotiplerinin belirlendiği bir çalışmada (İlhan ve Keleş, 2007), arabinoz, ksiloz ve trehaloz fermentasyon test sonuçlarına göre izolatların 57 (%86.3)'sinin biyotip A, 9 (%13.6)'unun ise biyotip T olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada (Şahin, 2017) ise, koyunlardan izole edilen 16 *M. haemolytica* izolatının tamamının trehaloz negatif, arabinoz ve ksiloz pozitif, 13 (%81.3)'ünün de laktoz pozitif olduğu tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre izolatların tamamının biyotip A (ksiloz ve arabinoz pozitif) olarak tanımlandığı rapor edilmiştir.

Sunulan bu çalışmada da, incelenen 48 *M. haemolytica* izolatının tamamının kanlı agarda β hemolitik koloni oluşturduğu, MacConkey agarda üremediği ve indol negatif olduğu belirlendi. Bununla birlikte, izolatların biyokimyasal yöntemle identifikasyonunda kullanılan kitlerdeki biyokimyasal testler arasında arginin-arginin ve sorbitol fermentasyon özelliklerine göre izolatların 4 farklı biyokimyasal profile sahip olduğu ve biyokimyasal profil II'nin hastalık olgularından izole edilen izolatlar ile ilişkili olduğu ve bu ilişkinin sadece arginin negatif izolatlardan kaynaklandığı tespit edildi. *M. haemolytica* saha izolatları arasında biyokimyasal özelliklerin farklılık gösterebileceği ve bunun olumsuz çevre şartları, konakçı farklılığı ve Gram negatif bakteriler arasında genetik aktarımın neden olabileceği düşünülmektedir.

M. haemolytica izolatlarında virülens ile ilişkili genlerin varlığına yönelik PCR yöntemiyle yapılan çalışmalarda ise; günümüze kadar *M. haemolytica* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların patogeneziinde rol oynayan; kapsül (*nmaA*, *nmaB*), lipopolisakarit (*lic2*, *lpsA*), demir bağlama proteinleri (*urp*, *tonB*, *tbpA*, *tbpB*), dış membran protein ve lipoproteinleri (*OmpA*, *fhaC*, *Iga1*, *plpD*, *plpE*, *gs60*), adhezin ve fimbria (*adh*, *hf*, *pilA*, *pilD*, *ssa*) ve lökotoksin (*lktA*, *lktC*), O-sialoglikoproteaz (*gcp*), nörominidaz (*nanH*) ve süperoksitdismutaz (*sodA*, *sodC*) olmak üzere, ekstrasellüler enzimlerin sentezinde rol oynadığı bildirilen 25 farklı virülens ile ilişkili gen tanımlanmıştır (Fisher ve ark., 1999; Highlander ve ark., 2001; Lo ve ark., 2006; Gioia ve ark., 2006; Adamu ve ark., 2007; Singh ve ark., 2011; Hounscome, 2012; Puchalski ve ark., 2013; Klima ve ark., 2014; El Dokmak ve ark., 2015; Garcia-Alvarez ve ark., 2018; Nefedchenko ve ark., 2019).

Farklı hayvan gruplarından elde edilen 248 *M. haemolytica* ve *Biberstenia trehalosi* izolatında lökotoksin (*lktA*) geninin tespitine yönelik bir çalışmada (Fisher ve ark., 1999), izolatların 108'inde lökotoksin geni tespit edildiği, bu izolatların 90'ının *M. haemolytica*, 18'inin ise *Biberstenia trehalosi* olduğu bildirilmiştir. Araştırmada, lökotoksinin, pnömonik pastörelloz oluşumunda majör virülens faktör olduğu ve diğer virülens faktörlerinin ise etkenin kolonizasyonu ve hastalık oluşumunda indükleyici faktörler olarak rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada da (Kırkan, 2003), akciğerinde pnömonik lezyonlar gözlenen koyunlardan izole edilen 22 *M. haemolytica* ve 2 *Biberstenia trehalosi* izolatının tamamında *lktA* geninin tespit edildiğini ve lökotoksin geninin, pnömonik pastörelloz vakalarında en önemli virülens faktörü olduğu rapor edilmiştir.

M. haemolytica ile enfekte edilen 29 buzağıdan elde edilen *M. haemolytica* izolatlarında Reverse-Transkriptaz PCR yöntemi ile virülens ile ilişkili genlerin varlığına yönelik yapılan deneysel bir çalışmada (Lo ve ark., 2006) izolatların tamamında *lkt*, *gs60*, *adh* ve *gcp* genlerinin akciğer dokusunda eksprese olduğu tespit edilirken, *tbp* ve *nma* genlerinin belirlenemediği rapor edilmiştir. Araştırmada *M. haemolytica* izolatlarında en önemli virülens faktörünün lökotoksin olduğu, *nma* ve *tbp* genlerinin tespit edilememesinin hastalığın enfeksiyon safhası ile ilgili olabileceği bildirilmiştir.

Sığır, koyun ve keçilerden izole edilen 20 *M. haemolytica* izolatında yapılan çalışmada (Saed ve ark., 2015), bir sığırın nazal bölgesinden ve bir koyunun da akciğer dokusundan elde edilen sadece iki izolatta *gcp* geni tespit edildiği bildirilmiştir. El Dokmak ve ark. (2015) sığır ve koyunlardan izole edilen 7 adet *M. haemolytica* izolatının virülens ile ilişkili genlerine yönelik yapılan diğer bir çalışmada, izolatların tamamında *gcp* ve *gs60* genlerinin tespit edildiği bildirilmiştir.

Koyunlardan elde edilen 121 *M. haemolytica* izolatında virülens ile ilişkili 16 genin incelendiği diğer bir çalışmada ise (Garcia-Alvarez ve ark. 2018), *lktA*, *tbpA*, *tbpB* ve *tonB* genleri izolatların tamamında tespit edilirken, *adh* (%97.5), *fhaC* (%94.2), *gcp* (%79.3), *hf* (%79), *irp* (%59.5), *lpsA* (%65), *nanH* (%99.2), *pilA* (%95.8), *plpD* (%95.8), *pomA* (%97.6), *sodA* (%91.7) ve *sodC* (%19) genlerinin farklı oranlarda bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmada pnömonili koyunlardan elde edilen izolatlarda sadece *irp* geninin hastalıkla ilişkili bulunduğu, hasta ve sağlıklı hayvanlardan izole edilen *M. haemolytica* izolatları arasında virülens ile ilişkili genlerin dağılımının homojen olduğu sonucuna varıldığı rapor edilmiştir. Buna karşın, Sibiry ve Kazakistan'da solunum yolu enfeksiyonu gözlenen buzağılardan alınan akciğer örneklerinden elde edilen 54 *M. haemolytica* izolatının 7 (%13)'ünde lökotoxin geni bulunmadığı bildirilmiştir (Nefedchenko ve ark. 2019).

Yapılan bu çalışmada, sığır ve koyunların solunum yolundan izole edilen 48 *M. haemolytica* izolatının 46 (%95.8)'sında *gcp*, 42 (%87.5)'sinde *gs60*, 28 (%58.3)'inde *tbpB*, 45 (%93.8)'inde *lktC*, 8 (%16.7)'inde *nmaA*, 44 (%91.7)'ünde *adh* genleri tespit edildi. Araştırmada tespit edilen lökotoxin gen pozitif izolat sayısı, Fisher ve ark. (1999) ve Nefedchenko ve ark. (2019) tarafından bildirilenden yüksek, Kırkan (2003), Lo ve ark. (2006) ve Garcia-Alvarez ve ark. (2018) tarafından bildirilenden ise düşük olduğu belirlendi. Lökotoxin genlerinin farklı oranlarda tespit edilmesinin lökotoxini kodlayan birden fazla gen bölgesinin bulunmasından kaynaklanabileceği, ayrıca bölgesel koşullar ve hayvan türlerine göre de gen varlığının farklılık gösterebileceği kanısına varıldı. Sialoglikoproteaz (*gcp*) ve dış membran lipoprotein (*gs60*) pozitif izolat sayısı; Lo ve ark. (2006) tarafından tespit edilenden düşük, El Dokmak ve ark. (2015) tarafından tespit edilenden ise yüksek olduğu belirlendi. Sunulan bu çalışma ile *gcp* ve *gs60* genlerinin *M. haemolytica* izolatlarında yüksek oranda (%95.8 ve %87.5)

bulunması dolayısıyla *M. haemolytica*'nın saha izolatlarında olumsuz çevre koşulları ve *in vivo* ortamlarda immun yanıt tepkisi olarak sentezlenme gereksiniminin suştan suşa farklılık gösterebileceği düşünüldü. UDP-N-asetil-D-glikozamin-2-epimeraz (*nma*), demir bağlama proteini (*tbp*), adhezyon (*adh*) gen pozitif izolat sayısı ise Lo ve ark. (2006) ve Garcia-Alvarez ve ark. (2018) tarafından bildirilenden daha yüksek olduğu tespit edildi. Yapılan bu çalışma ile *M. haemolytica* izolatlarında *tbpB* genlerinde heterojenitenin yüksek olduğu ve hastalık olgularından izole edilen genlerde tespit edilebileceğinden dolayı patojen ve kommensal *M. haemolytica* izolatlarının ayırımında kullanılabilir bir kriter olabileceği, *nmaA* geninin ise izolatların büyük çoğunluğunda tespit edilemediği (%91.7) ve kapsül genini kodlayan başka gen bölgelerinin olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, araştırmada incelenen izolatlarda virülens ile ilişkili genlerin dağılımına göre farklı gen profilleri belirlendi. Profil II'ye sahip izolatların tamamında tüm virülens ile ilişkili genlerinin bulunduğu, profil I'e sahip izolatlarda *nmaA*, profil III'e sahip izolatlarda ise *nmaA* ve *tbpB* genleri tespit edilemedi. İzolatların %83.3'ünde virülens gen profil I (%37.5), III (%33.3) ve II (%12.5) belirlenirken, virülens gen I profiline sahip izolatların arginin-arginin negatif, virülens gen profil III'e sahip izolatların ise argininin-arginin pozitif izolatlar ilişkisi olduğu belirlendi. Genel olarak, *M. haemolytica* izolatlarında virülens genlerin heterojeniteye sahip olduğu ve bunun en önemli nedenlerinden birinin etkenin farklı bakteri türleri ile miks enfeksiyon meydana getirmesi dolayısıyla plazmid ve transpozon gibi ekstrakromozomal DNA'lar aracılığı ile bazı virülens faktörlerini kodlayan yeni genlerin taşınabileceği, diğer nedenin ise virülens faktörlerinin birden fazla gen tarafından kontrol edilmesinden kaynaklanabileceği kanaatine varıldı.

Bakteriyel etkenlerde artan antimikrobiyal direnç antimikrobiyal tedavinin yetersiz kalmasına neden olduğundan, etkili antimikrobiyal tedavi için etkenin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi ve tedavide uygun antibiyotiğin kullanılması gerekmektedir. *M. haemolytica* izolatlarında birden fazla antimikrobiyal madde grubuna karşı çoklu direnç geliştiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. (Kehrenberg ve ark., 2001; Benedict ve ark., 2013; Catry ve ark., 2007; Gürbüz ve ark. 2003; Baysan 2007; Esaki ve ark. 2005; Solmaz ve İlhan 2011; Blondeau ve ark., 2012; Abera ve ark., 2014; El Garch ve ark., 2016; Şahin, 2017; Nefendchenko ve ark., 2019).

Disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak yapılan antimikrobiyal direnç sürveyans modelleme çalışmasında (Benedict ve ark., 2013), sığırlardan elde edilen 1574 *M. haemolytica* izolatında, ampisilin, streptomisin, tetrasiklin ve sülfamethaksazol+trimethoprim karşı değişen oranlarda direnç tespit edildiği bildirilmiştir. Araştırmada, *M. haemolytica* izolatlarında antimikrobiyal direncin belirlenmesinde her iki duyarlılık testinin kullanılabilceği, ancak broth mikrodilüsyon yönteminin daha duyarlı bulunması nedeniyle ileriye yönelik sürveyans çalışmalarında kullanılacak antimikrobiyal duyarlılık testinin dikkatli seçilmesi gerektiği rapor edilmiştir.

Catry ve ark. (2005), sığırlardan izole edilen 25 *P. multocida* ve 2 *M. haemolytica* izolatının MİK değerlerinin agar dilüsyon yöntemiyle incelendiği çalışmada, *P. multocida* izolatlarının 5 (%20)'inin oksitetrasikline karşı dirençli olduğu ve MİK değerlerinin 0.125-32 µg/ml olarak belirlendiğini, *M. haemolytica* izolatlarının ise tamamının oksitetrasikline duyarlı olduğu ve MİK değerlerinin 0.5 µg/ml olarak tespit edildiği bildirilmiştir.

Japonya'da sığırlardan elde edilen 27 *M. haemolytica* izolatının agar dilüsyon yöntemiyle incelendiği bir araştırmada, izolatların 20 (%74.1)'si uygulanan 11 antimikrobiyal maddenin tümüne duyarlı bulunurken, dirençli bulunan 7 izolatın 3'ü sadece dihidrostreptomisine, 1'i sadece bikoza mine, 1 (%3.7)'i oksitetrasiklin ve doksisisikline, 1 (%3.7)'i benzilpenisilin, aspoksilin, dihidrostreptomisin, kanamisin, oksitetrasiklin, doksisisiklin, kanamisin ve tiamfenikole; 1 (%3.7)'i amoksisilin, aspoksilin, mesillinam, dihidrostreptomisin, kanamisin, oksitetrasiklin, doksisisiklin, kloramfenikol ve tiamfenikole dirençli olduğu rapor edilmiştir (Esaki ve ark., 2005). Katsuda ve ark. (2009) Japonya'da agar dilüsyon yöntemiyle 229 *M. haemolytica* sığır izolatından 39 (%17)'unun nalidiksik asit, 11 (%4.8)'inin de enrofloksasin ve danofloksasine dirençli bulunduğu bildirmiştir.

Belçika'da sığırlardan izole edilen 31 *M. haemolytica* izolatının agar dilüsyon yöntemi ile %38.2'sinin ampisilin, %35.5'inin oksitetrasiklin, %9.7'sinin gentamisin, %14.7'sinin enrofloksasin ve %22.2'sinin de sülfamethaksazol-trimethoprim dirençli bulunurken, disk difüzyon yöntemi ile %32.4'ünün ampisilin, %26.5'inin oksitetrasiklin, %16.1'inin gentamisin, %14.7'sinin enrofloksasin ve %25.9'unun da

sülfamethaksazol-trimethoprima dirençli olduğu bildirilmiştir. Araştırmada, antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde agar dilüsyon yönteminin güvenilir olduğu, disk difüzyon yönteminin ise epidemiyolojik sürveyans çalışmalarında kullanılabileceğini, ancak çoklu direnç belirlenen izolatlarda disk difüzyon yöntemi ile yanlış sonuçlar elde edilebileceği rapor edilmiştir (Catry ve ark., 2007).

Kanada’da sığırlardan elde edilen 285 *M. haemolytica* izolatında mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin belirlendiği bir çalışmada, enrofloksasin, ceftiofur için MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerinin 0.016-0.125 µg/ml, tilmikosin için de 2-8 µg/ml olarak bulunduğu, tüm izolatların incelenen antimikrobiyal maddelere karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir (Blondeau ve ark., 2012). Sığırlardan izole edilen 13 *M. haemolytica*, 11 *P. multocida* ve 4 *Biberstenia trehalosi* izolatının disk difüzyon yöntemiyle incelendiği diğer bir çalışmada ise, izolatların tamamı amoksisiline duyarlı bulunurken, tetrasiklin, eritromisin ve penisilin-G’ye orta duyarlı olduğu bildirilmiştir (Abera ve ark., 2014).

El Garch ve ark. (2016), sığırlardan izole edilen 134 *P. multocida* ve 149 *M. haemolytica* izolatında, broth mikrodilüsyon yöntemiyle incelenen *P. multocida* izolatlarının 4 (%3)’ünün enrofloksasin ve 15 (%11.2)’inin tetrasikline dirençli, *M. haemolytica* izolatlarının ise 1 (%0.7)’inin enrofloksasin, 18 (%12.1)’inin tetrasiklin ve 6 (%4)’sının da tilmikosine dirençli bulunduğunu bildirmiştir. Nefendchenko ve ark. (2019), sığırlardan izole edilen 54 *M. haemolytica* izolatında, disk difüzyon yöntemiyle incelenen izolatların 9 (%16.7)’unun gentamisin, 9 (%16.7)’unun streptomisin, 12 (%22.2)’sinin ampisilin, 18 (%33.3)’inin benzilpenisilin, 4 (%7.4)’ünün enrofloksasin, 1 (%1.9)’inin sülfamethaksazol+trimethoprim ve 9 (%16.7)’unun da tetrasikline dirençli bulunduğunu bildirmiştir.

Ülkemizde farklı bölgelerdeki koyunların pnömonik akciğer dokusundan alınan örneklerden elde edilen *M. haemolytica* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle incelendiği çalışmalarda ise; Şanlıurfa yöresinde incelenen 30 *M. haemolytica* izolatının 21 (%70)’inin amoksisilin, 12 (%40)’sinin ampisilin, 3 (%10)’ünün eritromisin, 4 (%13)’ünün tetrasiklin, 1 (%3)’inin streptomisin ve 1 (%3)’inin gentamisine dirençli olduğu rapor edilmiştir (Tel ve Keskin, 2010). Van yöresinde yapılan diğer bir çalışmada ise, incelenen 21 *M. haemolytica* izolatının 19 (%90.4)’unun enrofloksasin ve sülfamethaksazol+trimethoprim, 16 (%76.1)’sının eritromisin, kloramfenikol ve

oksitetrasiklin, 15 (%71.4)'inin gentamisin, 10 (%47.6)'unun da ampicilin/sulbaktam, linkomisin ve penisilin-G'ye duyarlı olduğu rapor edilmiştir. (Solmaz ve İlhan, 2011). Samsun yöresinde yapılan bir araştırmada ise incelenen 16 *M. haemolytica* izolatının tamamının, oksitetrasiklin, gentamisin ve eritromisine duyarlı olduğu, 1 izolatın enrofloksasin, 4 izolatın sülfamethaksazol + trimethoprim, 15 izolatın da ampisiline dirençli olduğu bildirilmiştir. Araştırmada *M. haemolytica*'nın primer etken olduğu pnömoni vakalarından elde edilen izolatların antimikrobiyal direnç profillerinin yıllara ve bölgelere göre değişiklik gösterebileceği rapor edilmiştir (Şahin, 2017).

Sunulan bu çalışmada ise, E test ile incelenen 48 *M. haemolytica* izolatından sadece 9 (%18.8)'unda direnç tespit edildi. Bu izolatlardan 1'i eritromisine, 2 (%4.2)'si de penisiline dirençli bulunurken, 1 (%2.1)'inde tilmikosin ve penisiline, 1 (%2.1)'inde tilmikosin, streptomisin ve penisilin, 1 (%2.1)'inde eritromisin, tilmikosin, streptomisin ve tetrasiklin ve 3 (%6.2)'ünde de eritromisin, tilmikosin, streptomisin, tetrasiklin, penisilin ve ampisiline olmak üzere çoklu direnç tespit edildi. Dirençli izolatlarda MİK değerlerinin ise; eritromisine dirençli 1 izolatta 16 µg/ml, penisiline dirençli 2 izolatta 1-1.5 µg/ml, tilmikosin ve penisiline dirençli bir izolatta 64<-1, tilmikosin, streptomisin ve penisiline dirençli 1 izolatta 32, 64, 1 µg/ml, eritromisin, tilmikosin, streptomisin ve tetrasikline dirençli 1 izolatta 24, 32, 64 ve 12 µg/ml olarak tespit edildi. Eritromisin, tilmikosin, streptomisin, tetrasiklin, penisilin ve ampisiline dirençli bulunan 3 izolatın 2'inde MİK değerlerinin 24-64 µg/ml, 1'inde ise 1.5-64 µg/ml aralığında değişkenlik gösterdiği belirlendi. E testi ile sadece penisillin ve sadece penisillin ve tilmikosine dirençli bulunan 3 izolat ile tilmikosin, streptomisin ve penisiline dirençli 1 izolat, eritromisin, tilmikosin, streptomisin ve tetrasikline dirençli 1 izolat ve eritromisin, tilmikosin, streptomisin, tetrasiklin, penisilin ve ampisiline dirençli 1 izolat da disk difüzyon testinde penisilline duyarlı bulundu. Bununla birlikte çalışmada kullanılan 48 izolatın tamamı gentamisin, ceftazidim, enrofloksasin ve sülfamethaksazol+trimethoprime her iki test yöntemiyle de duyarlı olduğu tespit edildi. Araştırmada incelenen *M. haemolytica* izolatlarında belirlenen antimikrobiyal direnç oranları; Tel ve Keskin (2010), Solmaz ve İlhan (2011), Şahin (2017), Catry ve ark. (2007), El Garch ve ark. (2016), Nefedchenko ve ark. (2019)' tarafından bildirilen oranlardan düşük, bulunurken, Catry ve ark. (2005), Esaki ve ark. (2005) ve Blondeau ve ark. (2012) tarafından bildirilen oranlardan yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca

tetrasiklin ve tilmikosine dirençli olan izolatlarda MİK değerlerinin yüksek olduğu, bunun nedeninin ise Van bölgesinde bu iki antimikrobiyal maddenin gerek profilaktik gerekse terapötik amaçla yüksek oranda kullanılmasından kaynaklanabileceği kanısına varıldı. Bunun yanı sıra *M. haemolytica* izolatları arasında antimikrobiyal direnç çeşitliliği ve direnç oranları arasındaki farklılığın, bölgeden bölgeye ve yıllara göre gerek tedavi gerekse profilaktik amaçlı kullanılan antimikrobiyal maddeler ile antimikrobiyal direncin belirlenmesinde kullanılan test yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

M. haemolytica izolatlarında antimikrobiyal direnç genellikle plazmid ve transpozon gibi ekstrakromozomal genetik elemanlarla ve çok hızlı bir şekilde yayılmakta ve böylece çok çeşitli antimikrobiyal maddelere karşı direnç oluşumuna yol açmaktadır. Antimikrobiyal direnç ile ilişki genlerin varlığına yönelik PCR çalışmalarında; Fransa'da sığırlardan izole edilen ve agar dilüsyon ve disk difüzyon yöntemiyle amoksisilin/klavulonikasit ve tikarsilin/klavulonikasite dirençli bulunan 1 *M. haemolytica* ve 2 *P. multocida* izolatında MİK değerlerinin yüksek (128-256 µg/ml) bulunduğu ve bu izolatlarda plazmid DNA ekstraktının kullanıldığı PCR testinde de *bla_{ROB-1}* geni tespit edildiği rapor edilmiştir (Livrelli ve ark., 1988)

Sığır ve domuzlardan elde edilen ve disk difüzyon ve broth dilüsyon yöntemleri ile sülfamethaksazol ve streptomisine dirençli bulunan 4 *M. haemolytica* ve 4 *P. multocida* izolatında yapılan bir çalışmada (Kehrenberg ve Schwarz, 2001), *M. haemolytica* izolatlarının 1'inden ve *P. multocida* izolatlarının da 2'sinden elde edilen plazmid ve kromozomal DNA örneklerinde sülfanamid direnç geni *sulII* ve streptomisin direnç geni *strA* tespit edildiği bildirilmiştir. Almanya'da sığırlardan elde edilen toplam 302 *M. haemolytica* ve *P. multocida* izolatında yapılan diğer bir çalışmada (Schwarz ve ark., 2004) da, mikrodilüsyon yöntemiyle streptomisine dirençli bulunan 5 izolatın 4'ünde *strA* geni saptanmıştır. Kehrenberg ve ark. (2005) da, sığırlardan elde edilen ve tetrasikline dirençli bulunan 2 *P. multocida* ve 3 *M. haemolytica* izolatında tetrasiklin direnç genlerinden *tetK* ve *tetL* genlerinin sadece 2 *M. haemolytica* izolatında tespit edildiği bildirmiştir.

Katsuda ve ark. (2009), agar dilüsyon yöntemiyle enrofloksasin ve danofloksasine dirençli 11 (MİK aralığı 0.063–16.0 µg/ml) ve nalidiksik aside dirençli

39 izolat (MİK aralığı 0.5-256 µg/ml) ile birlikte duyarlı bulunan 14 *M. haemolytica* izolatında florfenikol grubu *gyrA* ve *parC* genlerinin tespit edildiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, kloramfenikol (MİK 64µg/ml), florfenikol (32 µg/ml), oksitetrasiklin (64 µg/ml), kanamisin (512 µg/ml), dihydrostreptomisin (512 µg/ml), nalidiksik asit (256 µg/ml), ampisilin (512 µg/ml) ve amoksisiline (512 µg/ml) dirençli olduğu tespit edilen 1 *M. haemolytica* izolatında da florfenikol direnç geni taşıyan 7.7 kb büyüklüğünde plazmid izole edildiğini bildirmişlerdir (Katsuda ve ark., 2012).

Klima ve ark. (2011)'ı sığırlardan izole edilen 16 *M. haemolytica* izolatının disk difüzyon yöntemiyle sadece oksitetrasiklin, 13'ünün sadece ampisilin, 2'sinin de ampisilin ve oksitetrasikline dirençli olduğunu, oksitetrasikline dirençli 16 izolatta *tetH*, tilmikosine orta dirençli bulunan bir izolatta *ermX*, ampisiline dirençli 2 izolatta da *bla_{ROB-1}* geni tespit edildiğini, oksitetrasikline dirençli izolatların hiçbirinde *tetB*, *tetG*, *tetK*, *tetL* ve *tetM* tetrasiklin direnç genlerinin bulunmadığını bildirmiştir.

Desmolaize ve ark., (2011), sığırlardan elde edilen 4 *M. haemolytica* izolatından 1'inin tulatromisin, gamitromisin, tilmikosin ve klindamisine duyarlı bulunduğunu ve bu izolatta makrolid direnç genlerinin tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Çalışmada söz konusu antimikrobiyal maddelere dirençli bulunan 3 izolattan 1'inde sadece *msrE* ve *mphE* genleri, 2'sinde de *erm42*, *mphE* ve *msrE* genlerinin tamamının tespit edildiği ve her üç geni taşıyan izolatlarda belirlenen MİK değerlerinin de daha yüksek (64-1024 µg/ml) bulunduğu bildirilmiştir.

Sığırlardan elde edilen 22 *M. haemolytica* izolatında makrolid direnç genlerinin varlığına yönelik benzer bir çalışmada, sadece *erm42* geni taşıyan 1 *M. haemolytica* izolatında gamitromisin MİK değerinin düşük (4 mg/L), tildiprosin MİK değerinin ise yüksek (32 mg/L) olduğu, her üç geni de taşıyan 21 *M. haemolytica* izolatında ise bu değerlerin 32-64 mg/L arasında değiştiği rapor edilmiştir (Eidam ve ark., 2012).

Kanada'da yapılan diğer bir çalışmada sığırlardan izole edilen 90 *M. haemolytica* izolatının 16 (%18)'sının en az 1 antimikrobiyal maddeye dirençli olduğu; oksitetrasikline dirençli izolatlarda *tetH*, penisilin ve ampisiline dirençli izolatlarda da *bla_{ROB-1}* geni belirlenirken, tilmikosine dirençli 5 izolatta makrolid direnç genlerinin saptanmadığı bildirilmiştir (Klima ve ark. 2014).

Amerika’da yapılan benzer bir deneysel çalışmada, *M. haemolytica* ile enfekte 276 sığırdan farklı sürelerde uygulanan gamitromisin tedavisi sonrasında sadece 11 sığırdan elde edilen *M. haemolytica* izolatlarından sadece 2’sinin söz konusu antimikrobiyal maddeye dirençli olduğu, incelenen dirençli izolatlarda makrolid direnç genlerinin tespit edilmediği bildirilmiştir (Dedonder ve ark., 2016).

Yapılan bu çalışmada, E-test yöntemiyle antimikrobiyal direnç tespit edilen 9 izolattan, MİK değeri 64 µg/ml olarak bulunan streptomisin dirençli 5 izolatın tamamında *strA* geni tespit edildi. Bu izolatların, MİK değerleri 32 µg/ml olan 2’sinde *erm42*, 3’ünde de *mphE* ve *msrE* makrolid direnç genleri tespit edildi. MİK değeri 16 µg/ml olarak bulunan eritromisine dirençli diğer 1 izolatta da sadece *mphE* geni bulunduğu belirlendi. Çoklu direnç belirlenen 3 izolattan 2’sinde tetrasiklin, ampisilin ve penisilin için MİK değerleri 32, 24 ve 32 µg/ml ve 1’inin de 8,4, 1.5 µg/ml bulunmasına rağmen *tetH* ve *bla_{ROB-1}* genleri tespit edilemedi. E-testi ile MİK değerleri tilmikosin için 64 < µg/ml ve penisillin için 1-1.5 µg/ml olarak bulunmasına rağmen, sadece penisilline dirençli 1 ve penisillin-tilmikosine dirençli bulunan 2 izolatta direnç genleri tespit edilemedi. Araştırmada elde edilen bulguların Kehrenberg ve Schwarz (2001) ile Schwarz ve ark. (2004)’nın elde ettiği *strA* geni bulgularından ve Desmolize ve ark. (2011)’nin elde ettiği *erm42* ile Dedonder ve ark. (2016)’nin elde ettiği *erm42*, *mphE* ve *msrE* geni bulgularından yüksek olduğu tespit edilirken, Desmolize ve ark. (2011)’nin elde ettiği *mphE* ve *msrE* geni bulgularından düşük; Livrelli ve ark. (1988) ile Klima ve ark (2011) elde ettiği *bla_{ROB-1}*, Kehrenberg ve ark. (2005) ile Klima ve ark (2011)’nin elde ettiği tetrasiklin direnç geni bulgularından düşük olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda antimikrobiyal direnç gen oranları arasında farklılık oluşması ve dirençli izolatlarda bazı direnç genlerinin tespit edilememesi, antimikrobiyal dirençten sorumlu birden fazla gen bölgesinin olabileceği ve bu genlerin kromozomal DNA dışında transpozon ve plazmid gibi mobil genetik yapılarla taşıyor olmasından kaynaklanabileceği, ayrıca antimikrobiyal dirençten sorumlu bir veya birkaç genin birlikte bulunduğu izolatlarda MİK değerlerinin yüksek olması, ilgili direnç geninin antimikrobiyal madde grubuna karşı bakteride fenotipik direncin oluşumunda önemli bir fonksiyonu olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

- Arginin-arginin negatiflik ile virülens gen I profiline sahip izolatların kommensal ve patojen *M. haemolytica* izolatlarının ayırımında kullanılabilecek epidemiyolojik kriter olabileceği ve konu ile ilgili yeni çalışmaların yapılması,
- *M. haemolytica* izolatlarının sülfanamid, enrofloksasin, ceftazidim ve gentamisine duyarlı olduğundan dolayı bu antimikrobiyal maddelerin *M. haemolytica* kaynaklı pnömoni tedavisinde etkili olabileceği düşünülürken, gelecekte *M. haemolytica* izolatlarında eritromisin, tilmikosin, streptomisin, tetrasiklin, penisilin ve ampisiline karşı direncin yükselme potansiyeline sahip olduğu ve karşılaştırmalı test yöntemleri kullanılarak yeni epidemiyolojik çalışmaların yapılması,
- Ayrıca, *M. haemolytica* izolatlarında *erm42*, *mphE*, *msrE* genlerinin makrolid, *strA* geninin de aminoglikozid direncinden sorumlu genler olduğu, total DNA'da tespit edilebildiği ve direnç geni tespit edilen izolatların büyük çoğunluğunda MİK değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenirken, *tetH* ve *bla_{ROB-1}* genlerinin total DNA'da tespit edilemediğinden dolayı bu genlerin plazmid ve transpozon gibi ekstrakromozomal DNA'da taşınabilen genler olabileceği, bu yüzden antimikrobiyal direnç ile ilgili başka mekanizmaların araştırılmasına yönelik yeni çalışmaların yapılması, gerektiği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Abera D, Sisay T, Birhuna T. Isolation and Identification of *Mannheimia* and *Pasteurella* species from pneumonic and apparently healthy cattle and their antibiogram susceptibility pattern in Bedelle District, Western Ethiopia. J Bacteriol Res. 2014; 6 (5): 32-41.
- Adamu, J.Y. *Mannheimia haemolytica*: phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. IJVM. 2007; 62 (1): 6-13.
- Ahmed HBM. *Mannheimia haemolytica*'dan lökotoksin üretimi için yeni besiyeri tasarımı ve ürün karakterizasyonu. [Doktora Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi. 2018.
- Ahmet M. Colonisation of the ovine respiratory tract by *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* [Master Thesis]. New Zealand: Massey University. 2003.
- Ahmed WA, Mohammed RJ, Khalaf IA. Molecular and phenotypical characterization of *Mannheimia haemolytica* isolated from goats in Baghdad Province. AIM. 2017; 7: 304-14.
- Aitken ID (Editor), Angus KW, Buxton D, Chianini F, RL Coop, Donachie W, ve ark. Pasteurellosis; Diseases of Sheep. UK: Blackwell Publishing Company; 2007; 224-31.
- Alexander TW, Cook SR, Yanke LJ, Booker CW, Morley PS, Read RR, ve ark. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. Vet Microbiol. 2008; 130 (1-2): 166-75.
- Al-Ghamdi MG, Ames RT, Baker CJ, Walker R, Chase CCL, Frank HG, ve ark. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* Isolates from The Upper Midwest United States. J Vet Diagn Invest. 2000; 12: 576-8.
- Allan EM, Wiseman A, Gibbs HA, Selman IE. Pasteurella species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns. Vet Rec. 1985; 117: 629-31.
- Ali Q, Davies RL, Parton R, Gibbs HA. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Pasteurella haemolytica* isolates from cattle and shep. J Gen Microbiol. 1992; 138: 2185-95.
- Angen Ø, Ahrens P, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet Mic. 2002; 84: 103-14.
- Angen Ø, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia*

- ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 1999; 49: 67-86.
- Angen O, Ahrens P, Kuhnert P, Christensen H, Mutters R. Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for the three species *incertae sedis* *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* and *Histophilus ovis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53: 1449-56.
- Angen Q, Aalbjek B, Falsen E, Olsen JE, Bisgaard M. Relationships among strains classified with the ruminant *Pasteurella haemolytica*-complex using quantitative evaluation of phenotypic Data. Zbl. Bakt. 1997; 285: 459-79.
- Arslan HH, Özcan U. Current approach to bovine respiratory disease. Dairy and Vet Sci J. 2018; 5 (2): 1-3
- Aulik NA, Hellenbrand KM, Kisiela D, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin binds cyclophilin D on bovine neutrophil mitochondria. Microbial Pathogenesis. 2011; 50: 168-78.
- Barbour EK, Nabbut NH, Hamadeh SK, Al-Nakhli HM. Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves. Vet Res Commun. 1997; 21 (6): 421-30
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45 (4): 493-6.
- Baysan RE. Aydın yöresinde sığırların solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan *Pasteurella* spp. etkenlerinin izolasyon, identifikasyon ve antibiyotiklere olan duyarlılığının araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Aydın, Adnan Menderes Üniversitesi; 2007.
- Baysal T, Güler L, Gündüz K. Koyun pnömonilerinden izole edilen *pasteurella haemolytica* suşlarının sensitite yöntemi ile antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Veterinarium. 1994; 5 (1-2): 13-16.
- Bell S. Respiratory disease in sheep: 2. Treatment and control. In Practice. 2008; 30: 278-283.
- Benedict KM, Gow SP, Checkley S, Booker W, MacAllister TA, Marley PS. Methodological comparisons for antimicrobial resistance surveillance in feedlot cattle. BMC Veterinary Research. 2013; 9: 216.
- Beytut E, Otlı S, Sözman M. Kars Bölgesi Koyunlarında Gözlenen Pnömoniler Üzerine Patolojik ve Etiyolojik İncelemeler. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 2002; 8 (1): 31-39.
- Biberstein EL, Gills M, Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell Vet. 1960; 50: 283-300.
- Biberstein EL, Gills MG. The relationship of antigenic types of the A and T types of *Pasteurella haemolytica* A. J. Comp. Pathol. Ther. 1962; 72: 316-320.

- Bisgaard M. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of Apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterisation of 213 Strains. Avian Pathology. 1977; 6: 285-292.
- Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL, Bisgaard M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55:353-362.
- Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, Bisgaard M. Reclassification of *Pasteurella trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 666–74.
- Blondeau JM, Borsos S, Blondeau LD, Blondeau BJJ, Hesje CE. Comparative minimum inhibitory and mutant prevention drug Concentrations of enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin against bovine clinical isolates of *Mannheimia haemolytica*. Vet Microbiol. 2012; 160: 85-90.
- Boudreaux CM. A novel strategy of controlling bovine pneumonic pasteurellosis: Transfecting the upper respiratory tract of cattle with a gene coding for the antimicrobial peptide cecropin B [Master Thesis]. USA: Louisiana State University, 2004.
- Broom AK, Sneath PHA. Numerical taxonomy of *Haemophilus*. J. Gen. Microbiol. 1981; 126: 123-49.
- Carter GR (1984). *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella*, chapter 11, in “Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology” Fourth Edition, 111-121, Charles C Thomas, U.S.A.
- Castillo JLR, Valencia GL, Monge-Navara FJ, Medina-Basulto GE, Hori-Oshima S, Cueto-Gonzalez SA, ve ark. Detection and economic impact related to bovine respiratory disease, shrink, and traveling distance in feedlot cattle in Northwest Mexico. Turk J Vet Anim Sci. 2017; 41: 294-301.
- Caswell JL, Williams KJ. Respiratory system. Maxie M.G. (Ed.) Jubb, Kennedy and Palmer’s Pathology of Domestic. 5. baskı. Edinburgh: Elsevier; 2016.
- Catry B, Dewulf J, De Kruif A, Vanrobaeys M, Haesebrouck F, Decostere A. Accuracy of susceptibility testing of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. Microb Drug Resist. 2007; 13 (3): 204-11.
- Catry B. *Pasteurella* and *Mannheimia* species from calves: Differentiation and antimicrobial resistance [PhD thesis]. Belgium; Ghent University. 2005.
- Chang YF, Renshaw HW, Richards AB. *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin: Physicochemical characteristics and susceptibility of leukotoxin to enzymatic treatment. Am J Vet Res. 1986; 47 (4): 716-23.

- Christensen H, Bojesen AM, Bisgaard M. *Mannheimia caviae* sp. nov. Isolated from epidemic conjunctivitis and otitis media in guinea pigs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011; 61: 1699-704.
- Christensen H, Bisgaard M. Revised definition of *Actinobacillus* sensu stricto isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. *Vet. Microbiol.* 2004; 99: 13-30.
- Clawson ML, Murray RW, Sweeney MT, Apley MD, DeDonder KD, Capik SF, ve ark. Genomic signatures of *Mannheimia haemolytica* that associate with the lungs of cattle with respiratory disease, an integrative conjugative element, and antibiotic resistance genes. *BMC Genomic.* 2016; 17: 982.
- Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, Whitworth LC, Hammer JD. Immunogenicity of recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE and augmentation of a commercial vaccine. *Vaccine.* 2003, 21 (21-22): 2821-29
- Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev.* 2009; 10 (2): 145-8.
- Dağ S, Gürbüz A, Özen H, Büyük F, Çelebi Ö, Karaman M, ve ark. Immunohistochemical and molecular detection of *Mannheimia* spp. and *Pasteurella* spp. in sheep with pneumonia in Kars Province – Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2018; 24 (2): 281-8.
- Daphal SH, Mhasa PP, Pawade MM, Shelke PP, Sangle JD, Kolhe RP. Emergence of virulent *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolytica* in sheep and goats of Western Maharashtra, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2018; 7 (9): 1990-1998.
- De la Mora A, Trigo F, Jaramillo L, Garfias Y, Solórzano C, Agundis C, ve ark. The N-acetyl-D-glucosamine specific adhesin from *Mannheimia haemolytica* activates bovine neutrophils oxidative burst. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 113 (1-2): 148-56.
- Dedonder KD, Harhay DM, Apley MD, Lubbers BV, Clawson ML, Schuller G, ve ark. Observations on macrolide resistance and susceptibility testing performance in field isolates collected from clinical bovine respiratory disease cases. *Vet Microbiol.* 2016; 192: 186-93.
- Demissie T, Dawo F, Sisay T. Biochemical and antigenic characterization of *Mannheimia*, *pasteurella* and *Mycoplasma* species from naturally infected pneumonic sheep and goats, Bishoftu, Ethiopia. *AJBAS.* 2014; 6 (6): 198-204.
- Deressa A, Asfaw Y, Lubke B, Kyule MW, Tefera G, Zessin KH. Molecular detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in sheep respiratory infections in Ethiopia. *Int J Appl Res Vet Med.* 2005; 8 (2): 101-7.
- Desmolaize B, Rose S, Wilhelm C, Warrass R, Douthwaite S. Combinations of macrolide resistance determinants in field isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 4128-33.
- Diker KS, Akan M. Evaluation of immunogenicity of *Pasteurella haemolytica* serotypes in experimental models. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2000; 24: 139-43.

- Diker KS, Akan M., Hazıroğlu R. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic ovine lungs. Vet. Rec. 1994; 134: 597-8.
- Eidam C, Michael GB, Kadlec K, Meyer K, Sweeney MT, Murray RW, ve ark. Increased MICs of gamithromycin and tildipirosin in the presence of the genes *erm(42)* and *msr(E)-mph(E)* for bovine *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. J Antimicrob Chemother. 2012; 67 (6): 1555-7.
- El Dokmak MM, Khalil SA, Ebied SKHM. Genetic diversity of *Mannheimia haemolytica* strains. AJVS. 2015; 47: 166-74.
- El Garch F, De Jong A, Simjee S, Moyaert H, Klein U. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs Across Europe, 2009–2012: VetPath results. Vet. Microbiol. 2016; 194: 11-22.
- Erdağ O, Erdoğan İ, Türkaslan J, Gürel A. Buzağı ve dana pnömonilerinde mikoplazma ve bakteriyel etkenlerin izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Pendik Vet. Microbiol. Derg. 1993; 24 (2): 143-8.
- Ermilio EM, Smith MC. Treatment of emergency conditions in sheep and goats. Vet Clin Food Anim. 2011; 27: 33-45.
- Esaki H, Asai T, Kojima A, Ishihara K, Morioka A, Tamura Y, ve ark. antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle in Japan from 2001 to 2002. J. Vet. Med. Sci. 2005; 67 (1): 75-7.
- Et ve Süt Kurumu. Et ve Süt Kurumu sektör değerlendirme raporu. Ankara. 2016.
- Fisher MA, Weiser GC, Hunter DL, Ward ACS. Use of a Polymerase Chain Reaction method to detect the leucotoxine gene *lktA* in biogrup and biovariant isolates of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella trehalosi*. Am. J. Vet. Res. 1999; 11: 1402-6.
- Garcia-Alvarez A, Garayzabal JF, Chaves F, Pinto C, Cid D. Ovine *Mannheimia haemolytica* Isolates from Lungs with and without Pneumonic Lesions Belong to Similar Genotypes. Vet Microbiol. 2018; 219: 80-6.
- Gioia J, Qin X, Jiang H, Clinkenbeard K, L0 R, Liu Y, ve ark. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into virulence, natural competence, and *Pasteurellaceae* phylogeny. J. Bacteriol. 2006; 7257-66.
- Global Animal Health Association, Animal breeding [İnternet]. 2019, [Erişim tarihi 17 Mayıs 2019]. Erişim adresi: <https://healthforanimals.org/zoonoses.html>.
- Gonzalez C, Murtaugh MP, Maheswaran SK. Genomic Distribution of a serotype antigen-coding DNA fragment of *Pasteurella haemolytica*. 1991; 599-609.
- Gülaydın Ö, Gürtürk K. İdentification of *Pasteurella multocida* strains isolated from respiratory tract of healthy and diseased cattle and determination of capsular types by PCR in Van Region. Van Vet J. 2018; 29 (3): 143-6.

Gülaydın Ö. Sığırların solunum yollarında izole edilen *Pasteurella multocida* fenotip ve genotiplerinde virülens genlerinin dağılımı (Doktora tezi). Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2018.

Güler L, Baysal T, Gündüz K, Erganiş O, Kaya O, Orhan G. Koyun ve keçilerden izole edilen *Pasteurella haemolytica* suşlarının biyotip ve serotiplendirilmesi. Veterinarium. 1996; 7 (1-2): 6-13.

Gürbüz A. Sığır ve koyunlara ait pnömonili akciğerlerden *Pasteurella haemolytica*'nın izolasyonu, identifikasyonu, biyotiplendirilmesi ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi. [Doktora Tezi]. Kars: Kafkas Üniversitesi. 2003.

Hadjadj L, Bentorl AA, Michelle C, Amoura K, Djahoudi A, Rolain JM. Genome sequence and description of *Mannheimia massilioguelpensis* sp. nov. New Microbe and New Infect. 2015; 8: 131–6.

Hassan GM, El-Feky ZA, Eissa EA, Teleb AA. Rapid diagnosis of virulent *Pasteurella multocida* isolated from farm animals with clinical manifestation of pneumonia respiratory infection using 16S rDNA and *KMT1* gene. Asian Pac. J. Trop. Dis. 2016; 6(1): 21–6.

Hauglund MJ, Tatum FM, Bayles DO, Maheswaran SK, Briggs RE. Genome sequences of serotype A6 *Mannheimia haemolytica* isolates D174 and D38 Recovered from Bovine Pneumonia. Genome Announc. 2015; 3(2): 15-6.

Hawari AD, Hassawi DS, Sweiss M. Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in sheep and goats using biochemical tests and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. J Biol Sci. 2008; 8(7): 1251-4.

Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, Frontiers in Bioscience. 2001; 6: 1128-50.

Hossain MM, Islam MS, Kamal AHM, Rahman AKMA, Cho HS. Dairy cattle mortality in an organized herd in Bangladesh. VeterinaryWorld. 2014; 7 (5): 331-6.

Hounscome JDA. Comparative outer membrane proteomic analyses of bovine and ovine isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Mannheimia glucosida* [PhD thesis]. UK; University of Glasgow. 2012.

İlhan Z, Keleş İ. Biotyping and serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolated from lung samples of slaughtered sheep in the Van Region. Turk J Vet Anim Sci. 2007; 31 (2): 137-41

Jaworski MD, Hunter DL, Ward ACS. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J Vet Diagn Invest. 1998; 10: 49-55.

Jesse FFA, Mubin HNA, Hambali IU, Lila MAM, Chung ELT, Abba Y, ve ark. Review on clinical management involving respiratory diseases in ruminants. Adv Anim. Vet. Sci. 2019; 7(4): 321-5.

- Jeyaseelan S, Sreevatsan S, Maheswaran SK. Role of *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin in the pathogenesis of Bovine Pneumonic Pasteurellosis. Anim. Health Res. Rev. 2002; 3: 69- 82.
- Katsuda K, Kohmoto M, Mikami O, Tamamura Y, Uchida I. Plasmid-mediated florfenicol resistance in *Mannheimia haemolytica* isolated from cattle. Vet Microbiol. 2012; 155: 444-7.
- Katsuda K, Kohmoto M, Mikamo O, Uchida I. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. Vet Microbiol. 2009; 139 (1-2): 74-9.
- Kaya O, Kırkan Ş. Aydın bölgesindeki sağlıklı ve pnömoni şüpheli koyunlardan *Pasteurella haemolytica*'nın izolasyonu, biyotip tayini ve antibiyotiklere duyarlılıkları. 1999; 24 (38): 21-5.
- Kehrenberg C, Schwarz S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. FEMS Microbiol Lett. 2001; 205 (2): 283-90.
- Kehrenberg C, Catry B, Haesebrouck F, De Kruif A, Schwarz S. tet(L)-mediated tetracycline resistance in bovine *Mannheimia* and *Pasteurella* isolates. J Antimicrob Chemoth, 2005; 56: 403-6.
- Kehrenberg C, Schulze-Tanzil G, Martel JL, Chaslus-Dancla E, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. J Microbiol Methods. 2001; 81: 39-47.
- Kırkan Ş, Kaya O. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* Strains Isolated from Pneumonic Lungs of Sheep in the Aydın Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29: 491-4.
- Kırkan Ş. Aydın yöresinde koyunların solunum sisteminde infeksiyon nedeni *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*'nın biyotip ve Serotip tayini, elektroforez ve PCR ile tanınması. [Doktora Tezi]. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi. 2003.
- Klima CL, Alexander TW, Hendrick S, McAllister AT. Characterization of *Mannheimia haemolytica* isolated from feedlot cattle that were healthy or treated for bovine respiratory disease. Can J Vet Res. 2014; 78 (1): 38-45.
- Klima CL, Alexander TW, Read RR, Gow SP, Booker CW, Hannon S ve ark. Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolated from the nasopharynx of feedlot cattle. Vet Microbiol. 2011; 149: 390-8.
- Klima CL, Alexander TW, Selinger LB, Read RR, Shewan PE, Gow SP ve ark. Comparison of repetitive PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for the genotyping of *Mannheimia haemolytica*. J Microbiol Methods 2010; 81 (1): 39-47.
- Klima CL, Zaheer R, Briggs RE, McAllister TA. A multiplex PCR Assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6. J. Microbiol Methods. 2017; 139: 155-60.

Koneman EW (Editor), Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC. Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. Third Edition. Lippincott Comp., Philadelphia, USA. 1988.

Kisiela DI, Czuprynski CJ. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. Infection and Immunity, Jan. 2009; 446–55.

Kumar A, Tikoo SK, Malik P, Kumar AT. Respiratory diseases of small ruminants. Hindawi Publishing Corporation Veterinary Medicine International. 2014; 373642: 2.

Kumar J, Shivendra D, Kumar R. Rapid detection of *Mannheimia haemolytica* in lung tissues of sheep and from bacterial culture. Veterinary World. 2015; 8 (9): 1073-7.

Laishevtcev AI, ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *Mannheimia haemolytica* (Features of biochemical identification and differentiation of *Mannheimia haemolytica*). RJOAS. 2016; 6 (54): 70-7.

Lee CW, PE Shewen. Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. Can J Vet Res. 1996; 60 (2): 127-32.

Lee RWH, Cornelisse M, Ziauddin A, Slack PJ, Hodgins DC, Strommer JN, ve ark. Expression of a modified *Mannheimia haemolytica* *gs60* outer membrane lipoprotein in transgenic alfalfa for the development of an edible vaccine against Bovine Pneumonic Pasteurellosis. J Biotechnol. 2008; 135: 224-31.

Lee RWH, Pool AN, Ziauddin A, Lo RYC, Shewen PE, Strommer JN. Edible vaccine development: stability of *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 during post-harvest processing and storage of field-grown transgenic white clover. Kluwer Academic Publishers Molecular Breeding. 2003; 11: 259-66.

Legesse A, Abayneh T, Mamo G, Gelaye E, Tesfaw L, Yami M, ve ark. Molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* Isolates associated with Pneumonic cases of sheep in selected Areas of Central Ethiopia. BMC Microbiol. 2018; 18: 205.

Lenette EH, Balows A, Hausler JWJ, Shadomy JH. Manual of Clinical Microbiology. 4. Baskı. Washington DC: American Society for Microbiology; 1985

Lı J, Clinkenbeard KD. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 1999; 67: 2920-7.

Livrelli V, Richaud AD, Rich CD, Joly BH, Martel JL. Genetic determinant of the ROB-1 β -lactamase in bovine and porcine *Pasteurella* strains. Antimicrob Agent Chemother. 1988; 32 (8); 1282-4.

Livrelli V, Peduzzi J ve Joly B. Sequence and molecular characterization of the ROB-1 beta-lactamase gene from *Pasteurella haemolytica*. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35 (2): 242-51.

- Lo RYC, McKerral JL, Hills LT, Konstrzynska M. Analysis of the capsule biosynthetic of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature. *Infect Immun.* 2001b; 69(7): 4458-64.
- Lo RYC, Sathiamoorthy S, Shewen PE. Analysis of *in vivo* expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 265: 18-25.
- Lo RYC, Strathdee CA, Shewen PE, Cooney BJ. Molecular studies of Ssa1, a serotype specific antigen of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun.* 1991; 3398-406.
- Lo RYC. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 2001a; 83: 23-35.
- McKerral JL, Lo RYC. Construction and characterization of an acapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect Immun.* 2002; 70(5): 2622-9.
- Michael GB, Eidam C, Kodlec K, Meyer K, Sweeney MT, Murray RW, et al. Increased MICs of gamithromycin and tildipirosin in the presence of the genes *erm(42)* and *msr(e)-mph(e)* for bovine *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (6): 1555-7.
- Mohamed RA, Abdelsalam EB. A review on Pneumonic Pasteurellosis (Respiratory Mannheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. *Bulg J Vet Med.* 2008; 11 (3): 139-60.
- Mohammadi GR, Ghazvini K, Abbas PH. Antimicrobial susceptibility testing of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves with dairy calf pneumonia. *Archives of Razi Institute.* 2006; 61 (2): 91-6.
- Morris EJ (1958). Selective Media for Some Pasteurella Species, *J. Gen. Microbiol.*, 19, 805-11
- Mutters R, Angen Q, Bisgaard M. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, Online Bergey's Manual Trust. (e-book). Published by John Wiley and Sons. in association with Bergey's Manual Trust. 2015. Doi: 10.1002/9781118960608.gbm01200.
- Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst Bacteriol.* 1985; 35: 309-22.
- Mutters R, Mannheim W, Bisgaard M. Taxonomy of the group. In *Pasteurella and Pasteurelloses*, pp. Edited by C. Adlam & J. M. Rutter London. Academic Press. 1989; 3-34.
- Nefedchenko AV, Glotova TI, Glotov AG. Isolation and antimicrobial resistance of *Mannheimia haemolytica* on dairy farms in Siberia. *Bulg J Vet Med.* 2019; 22 (4): 428-38.

Newsom IE, F Cross. Some Bipolar Organisms Found in Pneumonia of Sheep. J Am Vet Med Assoc. 1932; 80: 711–9.

Noyes NR, Benedict KM, Gow SP, Booker CW, Hannon SJ, McAllister TA, ve ark. *Mannheimia haemolytica* in feedlot cattle: prevalence of recovery and associations with antimicrobial use, resistance, and health outcomes. J Vet Intem Med. 2015; 29: 705-13.

Omaleki L, Browning FG, Allen JL, Barber SR. Molecular epidemiology of *Mannheimia haemolytica* and *Mannheimia glucosida* associated with ovine mastitis. JVDI. 2012; 24(4): 730-4.

Onderka DK, Wishart WD. Experimental contact transmission of *Pasteurella haemolytica* from clinically normal domestic sheep causing pneumonia in Rocky Mountain Bighorn Sheep. J Wildl Dis.1988; 24 (4): 663-7.

Önat K, Kahya S, Çarlı T. Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of Cattle. Turk J Vet Anim Sci. 2010; 34 (1): 91-4.

Özbey G, Muz A. Pnömonili Koyun ve Keçilerin Akciğerlerinden Aerobik Bakteri izolasyonları ve İzole *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica*'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması. Turk J Vet Anim Sci. 2004; 28: 209-16.

Öztürk D, Çorlu M. Pnömonili Koyun akciğerlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. Vet. Bil. Derg. 2006; 22 (1-2): 59-63

Öztürk İ, Civelek T. Burdur ve Isparta yöresi pnömonili koyunlardan izole edilen bakteriyel etkenler ve antibakteriyel duyarlılıkları. Vet. Bil. Derg. 2007; 23 (3-4): 45-50.

Pandher K, Confer AW, Murphy GI. Genetic and immunologic analyses of PlpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* Serotype 1. Infec Immun.1998; 5613-9.

Puchalski A, Chmiel RU, Dec M, Wernicki A. An electrophoretic characterization of iron-transporting proteins in *Mannheimia haemolytica* A1. Pol J Vet. 2013; 3: 527-32.

Punpanich W ve Srijuntongsiri S. *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* septicemia in an infant; [A case report]. J Infect Dev Ctries. 2012; 6(7): 584-7.

Quinn PJ (Editor), Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ ve Leonard FC. *Pasteurella* species and *Mannheimia haemolytica*. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. USA: Iowa State University Press. 22; 137-141. 2002.

Quinn PJ (Editor), Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, UK: John Wiley and Sons Ltd; 27: 300-308. 2011.

Rahal A, Ahmad AH, Prakash A, Mandil R, Kumar RT. Environmental attributes to respiratory diseases of small ruminants. Vet Med INT. 2014; 853627: 10.

- Rawat N, Gilhare VR, Kushwaha KK, Hattimare DD, Khan FF, Shende RK ve ark. Isolation and molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with pneumonia of goats in Chhattisgarh. *Vet World*. 2019; 12 (2): 331-6.
- Rensburg EV, Preez JC, Kilian SG. Influence of the growth phase and culture medium on the survival of *Mannheimia haemolytica* during storage at different temperatures. *J Appl Microbiol*. 2004; 96 (1): 154-61.
- Retzer MD, Yu RH, Zhang Y, Gonzales GC, Schryvers AB. Discrimination between apo and iron-loaded forms of transferrin by transferrin binding protein B and its N-terminal subfragment. *Microb Pathog*. 1998; 25 (4): 175-80.
- Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev*. 2008; 8 (2): 117-28.
- Rosadio R, Cirilo E, Manchego A, Rivera H. *Respiratory syncytial* and *parainfluenza type 3* viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. *Small Ruminant Res*. 2011; 97: 110-6.
- Rose S, Desmolaize B, Wilhelm C, Warrass R, Douthwaite S. Multiplex PCR to identify macrolide resistance determinants in *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (7): 3664-9.
- Rosmanith SER, Wilt GR, Wu G. Characterization and comparasion of antimicrobial susceptibilities and outer membran protein and plasmid DNA profiles of *Pasteurella haemolytica* and certain other members of the genus *Pasteurella*. *Am. J. Vet. Res*. 1991; 52 (12): 2016-22.
- Sader HS, Pignatari ACC. E-test: A novel technique for antimicrobial susceptibility testing. *Sao Paulo Med J*. 1994; 112 (4): 635-8.
- Saed M, Mageed ARA, Khalifa E. Genome sequences of *gcp* gene of *Mannheimia haemolytica* serotypes A1 and A2 associated with respiratory manifestation of ruminant in Egypt. *Global Veterinaria*. 2015; 14 (1): 142-8.
- Saeed IK, Ali YH, Taha KM, Mohammed NE, Nouri YM, Mohammed BA, ve ark. *Parainfluenza virus 3* infection in cattle and small ruminants in Sudan. *J Adv Vet Anim Res*. 2016; 3(3): 236-41.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbil Rev*. 2004; 28: 519-42.
- Setta A, Refaei E, Salem HM. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* infection in commercial layers; A case report. *J Egypt Vet Ved Assoc*. 2017; 77(2): 241-6.
- Shanthalingam S, Goldy A, Bavananthasivam J, Subramaniam R, Batra SA, Kugadas A, ve ark. PCR assay detects *Mannheimia haemolytica* in culture negative pneumonic lung tissues of Bighorn Sheep (*Ovis Canadensis*) from outbreaks in the Western Usa, 2009-2010. *J Wildl Dis*. 2014; 50 (1): 1-10.

Shewen PE, Wilkie BN. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. Can J Vet Res. 1988; 52: 30-36.

Shin SJ, Kang SG, Nabin R, Kang ML, Yoo HS. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. Vet Microbiol. 2005; 106: 73–7.

Singh F, Sonawane GG, Meena RK. Molecular detection of virulent *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in lung tissues of pneumonic sheep from semiarid tropics, Rajasthan, India. Turk J Vet Anim Sci. 2018; 42: 556-1.

Singh K, Ritchey JW, Confer AW. *Mannheimia haemolytica*: bacterial–host interactions in bovine pneumonia. Vet Pathol. 2011; 48(2): 338-48.

Solmaz H, İlhan Z. Pnöymonili koyun akciğerlerinden izole edilen *Mannheimia haemolytica* izolatlarının bazı antibiyotiklere *in vitro* duyarlılıklarının belirlenmesi. AVKAE. 2011; 1: 15-8.

Statham J. Respiratory disease in cattle a practical approach. Livestock. 2018; 23 (5): 206-13.

Straus DC, Purdy CW, Loan RW, Briggs RF, Frank GH. *In vivo* production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in market stressed cattle after natural infection. Curr Microbiol. 1998; 37 (4): 240-4.

Şahin İ. Samsun ili ve çevresinde koyun pnömonilerinden izole edilen *Mannheimia haemolytica* türlerinin fenotipik karakterizasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Samsun, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. 2017.

Şentürk B. Türkiye’de salgın hayvan hastalık sorunu ve yeni model önerileri. Harran Üniv Vet Fak Derg. 2015; 4 (1), 27-9.

Tahamtan Y, Hayati M. Multi drug resistance of *Pasteurella* spp. isolated from sheep and goats in Iran. Res J Microbiol. 2014; 9 (1), 51-8.

Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. Tarım ürünleri piyasaları kırmızı et raporu. Ankara. 2018; 21.

Taunde PA, Argenta FF, Bianchi RM, De Cecco BS, Vielmo A, Lopes BC, ve ark. *Mannheimia haemolytica* pleuropneumonia in goats associated with shipping stress. Ciencia Rural. 2019; 49(1): 1-6.

Tel OY, Keskin O. Koyun akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. YYÜ Vet Fak Derg. 2010; 21 (1): 31.

Tomassini L, Gonzales B, Weiser GC, Sischo W. An ecologic study comparing distribution of *Pasteurella trehalosi* and *Mannheimia haemolytica* between Sierra Nevada bighorn sheep, White Mountain Bighorn Sheep, and Domestic Sheep. J Wildl Dis. 2009; 45 (4): 930-40.

TÜİK Hayvancılık İstatistikleri (İnternet). 2019.[Erişim tarihi: 29.03.2020]. Erişim adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr>.

Umar S, Asif S, Riaz A, Abdullah Shah MA, Sohail ML. Isolation of *Mannheimia haemolytica* from layer hens showing respiratory clinical signs. Pak Vet J. 2018; 38 (1): 66-70.

Ülker H, Küçük D, Cantekin Z, Solmaz H. hatay yöresinde kesimhanede kesilen sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* I izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. AVKAE Derg. 2012; 2(2): 10-4.

Yavrucu E. *Mannheimia haemolytica*'nın sığır epitel hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi [Yüksek Lisans tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2008.

Yener Z, Gürtürk K, Gülbahar Y, Solmaz H. Bitlis mezbahasında kesilen keçilerde pnömoni olguları üzerinde patolojik ve bakteriyolojik çalışmalar. Vet Bil Derg, 2001;17 (1): 13-20.

Younan M. Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype. (17). Res Vet Sci. 1995; 58-98.

Yüzbaşıgil AF (2010). Kuzu pnömonilerinde patolojik ve bakteriyolojik incelemeler ile *Parainfluenza 3* (PI 3) virüsünün etiyolojideki rolü. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Zecchinon L, Fett T ve Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet Res. 2005; 36: 133-56.

ÖZGEÇMİŞ

Cihat ÖZTÜRK, 30.12.1986'da Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Seyhan'da tamamladı. 2012 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldu. Ocak 2014'de Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji A.D.'na Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) ile araştırma görevlisi olarak atandı. ÖYP kapsamında Selçuk Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulunda dil eğitimini başarıyla tamamladı. Ocak 2015'de Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji A.D.'nda doktora eğitimine başlamasının yanısıra ÖYP kapsamında atandığı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesinde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Raporu

Evrak Tarih ve Sayısı: 06/03/2018-17310



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 27552122-604.01.02-E.17310
Konu : Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN'e ait
Onay Gerektirmeyen Belge

06/03/2018

Sayın Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 01.03.2018 tarih ve 02 sayılı kararı gereğince, Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Sığır ve Koyunların Solunum Yollarından İzole Edilen *Mannheimia haemolytica* suşlarının tiplendirilmesi, bazı virulens genleri ile antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarının araştırılması" adlı çalışma ile ilgili, 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı ile yayınladığı yönetmeliğin 2. Maddesi 2. Fıkrasının b bendinde yer alan "Bu Yönetmelik; Deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını kapsamaz." hükmü gereğince YUHADYEK'ten Çalışma ve Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgeleri alınmasına gerek olmadığına karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalıdır

Prof. Dr. Semiha DEDE
Etik Kurulu Başkanı

Ek: Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN (1 sayfa)

Adres: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Zeve
Kampüsü 65080 Tuşba / Van
Telefon: +90 432 2251701-04 / +90 4445065 Faks: +90 432 4865413
e-Posta: yuhadyek@yyu.edu.tr Elektronik Ağ: http://www.yyu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için irtibat: Mehmet Şah OĞUZ
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni
Dahili No: 22007

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı : Sığır ve koyunların solunum yollarından izole edilen *Mannheimia haemolytica* suşlarının tiplendirilmesi, bazı virulens genleri ile antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması
Title of the Research : Typing and investigation of some virulence genes with antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* strains isolated from respiratory tract of cattle and sheep

Araştırmacı(lar) : Yürütücü / Chief investigator: Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN
Investigator(s) : Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Arş. Gör. Cihat ÖZTÜRK

Araştırmada kullanılacak hayvanlar / Animals to be used in the research:

Tür / species: Sığır ve Koyun Sayı / Numbers: 300-500
Yaş / Age: 1-8 Cinsiyet / Sex: Erkek ve dişi

Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: 01.02.2018

Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date: 30.12.2020

Dosya no / File no:

Karar:

Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmektedir. Tarih:01/03/2018 ; Karar no: 2018/02

Decision:

The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 01/03/2018 Decision number 2018/02

	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE Prof. Dr. N. Tuğba BINGÖL	ÜYE Prof. Dr. Süddik KESKİN	ÜYE Prof. Dr. Süphü DENİZ
ÜYE Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	ÜYE Doç. Dr. Atilla DURMUŞ	ÜYE Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
ÜYE Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Oruç ALLAHVERDİYEV	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Cansel Yılmaz DEMİR
ÜYE Yrd. Doç. Dr. Hacer ŞAHİN AYDINÇURU	ÜYE Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	ÜYE Zır. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU


Ek 2. Tez Orjinallik Raporu



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



DOKTORA TEZİ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	Sığır ve Koyunların Solunum Yollarından İzole Edilen <i>Mannheimia haemolytica</i> Suşlarının Tiplendirilmesi, Bazı Virulens Genleri ile Antimikrobiyal Maddelere Duyarlılıklarının Araştırılması			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
1	4	39	14	58
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %	
Turnitin		08/06/ 2020	%3	
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayfası hariç,				
- Teşekkür hariç,				
- İçindekiler hariç,				
- Simge ve kısaltmalar hariç,				
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)				
- Gereç ve yöntemler hariç,				
- Kaynakça hariç,				
- Alıntılar hariç,				
- Tezden çıkan yayınlar hariç,				
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.				
Gereğini bilgilerinize arz ederim.				
 Cihat ÖZTÜRK				
Öğrencinin Adı Soyadı	Cihat ÖZTÜRK			
Anabilim Dalı	Mikrobiyoloji			
Öğrenci No	149301046			
Programı	<input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora			

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN 	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Doç.Dr. Hamit Hakan ALP Sağlık Bilimleri Enstitüsü Başkanı 
---	--